

N° D'ORDRE : 193.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE
L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Guy PRIVAT

Pharmacien

Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie

Première thèse : RECHERCHES SUR LES PHANÉROGAMES
PARASITES (ÉTUDE D'« OROBANCHE HEDERÆ » DUBY)

Deuxième thèse : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 31 mars 1960 devant la Commission d'examen.

MM. P. MATHIAS *Président.*

L. EMBERGER.....

R. NOZERAN.....

J. SUSPLUGAS

} *Assesseurs.*

PARIS

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN (VI^e)

1961



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548326_0078

N° D'ORDRE : 193.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE
L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Guy PRIVAT

Pharmacien
Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie

Première thèse : RECHERCHES SUR LES PHANÉROGAMES
PARASITES (ÉTUDE D'« OROBANCHE HEDERÆ » DUBY)

Deuxième thèse : PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 31 mars 1960 devant la Commission d'examen.

MM. P. MATHIAS *Président.*

L. EMBERGER.....

R. NOZERAN.....

J. SUSPLUGAS.....

} *Assesseurs.*

PARIS

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN (VI^e)

1961

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

DOYEN

M. P. MATHIAS Professeur de Zoologie et de
Biologie générale.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. R. JACQUES, J. PAVILLARD, M. CASTERAS, M. CARRIÈRE, E. TURRIÈRE, J. SOULA
et G. DENIZOT.

PROFESSEURS TITULAIRES

MM. M. MOUSSERON	Chimie organique.
L. EMBERGER	Botanique.
C. BOUHET	Physique.
P. CHATELAIN	Minéralogie et Cristallogra- phie.
M ^{lles} O. TUZET	Zoologie et Biologie animale.
G. CAUQUIL	Chimie organique.
MM. J. GRANIER	Physique.
J. TROCHAIN	Botanique coloniale.
G. COUCHET	Mécanique supérieure.
J. SALVINIEN	Chimie Physique.
J. P. KAHANE	Mathématiques pures.
M ^{lle} A. VERGNOUX	Physique.
MM. J. AVIAS	Géologie.
M. SILBER	Chimie minérale.
J. DIVE	Mathématiques.
P. VIELES	Chimie.
J. RABINOVITCH	Physique.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. J. MOTTE Biologie végétale.
J. J. MOREAU Mathématiques.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. E. KAHANE	Chimie biologique.
R. JACQUIER	Chimie.
R. JOUTY	Physique.
B. CHARLES	Mathématiques.
R. NOZERAN	Botanique.
R. LAFONT	Physique.
C. CHALIN	Physique.
J. JULLIEN	Chimie.
A. CASADEVALL	Chimie.
Y. ASSENMACHER	Physiologie.
J. FALGUEIRETTES	Minéralogie.
J. RÉMY	Géologie.
C. ROUMIEU	Mathématiques.
M ^{lle} RENAUDIE	Mathématiques.
MM. PERETTI	Physique.
L. EUZET	Zoologie.
M. MATTAUER	Géologie.
P. CAILLON	Physique.
N. ANDRILLAT	Astronomie.
M. LEFRANC	Mathématiques.

SECRÉTAIRE HONORAIRE

M. J. DUBOIS.

SECRÉTAIRE PRINCIPAL

M. E. SIAU.



RECHERCHES SUR LES PHANÉROGAMES PARASITES (ÉTUDE D'OROBANCHE HEDERAE DUBY)

Par G. PRIVAT

SOMMAIRE

INTRODUCTION	*723
--------------------	------

CHAPITRE PREMIER. — ÉTUDE BIOLOGIQUE DES DIVERSES ÉTAPES DU CYCLE ÉVOLUTIF DE L'OROBANCHE DU LIERRE	727
--	-----

I. — LA GERMINATION	727
---------------------------	-----

A. — HISTORIQUE	727
-----------------------	-----

B. — RECHERCHES PERSONNELLES	729
------------------------------------	-----

I. — Étude morphologique et anatomique de la graine	729
---	-----

1. Morphologie	729
----------------------	-----

2. Anatomie et cytologie	731
--------------------------------	-----

a. Structure générale (732). — b. Le tégument (732). — c. L'albu-
men (733). — d. Le corps embryonnaire (733).

3. Conclusions	734
----------------------	-----

II. — Étude, in vitro, de la germination de l'Orobanche	734
---	-----

1. Essais préliminaires	735
-------------------------------	-----

a. Influence de l'imbibition (735). — b. Influence de la température
(736). — c. Influence de la lumière (736).

2. Essais en présence de la plante-hôte	736
---	-----

a. Techniques (736). — b. Essais préliminaires (737).

1. Récolte (737) ; — 2. Conservation (738) ; — 3. Température
(739) ; — 4. Imbibition (740) ; — 5. Lumière (740).

c. Influence du stimulant sécrété par les racines de Lierre (740).

1. Étude de l'énergie germinative (741) ; — 2. Influence de la dis-
tance avec l'hôte sur le pouvoir germinatif (741) ; 3. Essais
d'extraction des substances stimulantes (743) ; — 4. Spécificité
du stimulant (744).

3. Étude de la germination de l'Orobanche du Lierre en présence de substances chimiquement définies	745
--	-----

a. Techniques (746). — b. Essais en vue de lever une dormance
tégumentaire (747). — c. Essais en vue de lever une dormance
embryonnaire (749).

1. Étude des conditions physiques (749) ; — 2. Étude des
conditions biochimiques (749).

4. Conclusions	751
----------------------	-----

III. — <i>Observations morphologiques sur la germination des graines d'Orobanche</i>	752
II. — LA FIXATION DE L'OROBANCHE DU LIERRE SUR SON HÔTE.....	755
A. — HISTORIQUE	755
B. — RECHERCHES PERSONNELLES. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES SUIVIES..	759
I. — <i>Étude morphologique</i>	760
II. — <i>Étude anatomique et cytologique</i>	763
1. Progression des cellules du parasite dans l'hôte	763
2. Réaction de l'hôte à la pénétration du parasite	764
3. Contact vasculaire de l'Orobanche et du Lierre	769
4. Considérations sur les relations hôte-parasite	774
a. Au point de vue pénétration (774). — b. Au point de vue vasculaire (775). — c. Analogies entre une greffe et la fixation du parasite (776).	
III. — LE DÉVELOPPEMENT DE L'OROBANCHE DU LIERRE (Étude morphologique et anatomique)	780
A. — LE SUÇOIR DE L'OROBANCHE OU HAUSTORIUM. SA VALEUR MORPHOLOGIQUE	780
B. — LE JEUNE TUBERCULE	782
1. Les racines	782
2. Origine et développement de la hampe florale.....	789
C. — L'APPAREIL VÉGÉTATIF	790
1. La partie basale.....	791
2. La hampe florale	793
3. Les écailles	795
4. Les fleurs	795
D. — LE CYCLE VÉGÉTATIF DE L'OROBANCHE DU LIERRE.....	796
E. — L'OROBANCHE DU LIERRE, PLANTE VIVACE.....	797
F. — L'OROBANCHE DU LIERRE, PLANTE RAMEUSE	798
G. — INTERPRÉTATION DU STADE GERMINAL DE L'OROBANCHE	799
CHAPITRE II. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DE L'OROBANCHE DU LIERRE ET DE SON HÔTE	802
A. — HISTORIQUE	802
B. — LES PIGMENTS	803
I. — <i>Recherche et extraction du complexe total chlorophyllien</i>	804
II. — <i>Extraction et dosage des caroténoïdes</i>	804
III. — <i>Considérations</i>	806
1. Sur l'absence de chlorophylle	806
2. Sur la présence de caroténoïdes	806
C. — LES MATIÈRES MINÉRALES	808
D. — LES SUBSTANCES GLUCIDIQUES	810
I. — <i>Glucide insoluble : l'amidon</i>	810
1. Dans l'Orobanche	810
2. Dans le Lierre	811
3. Conclusions	811
II. — <i>Glucides solubles</i>	812

1. Variations	812
<i>a. Techniques (812). — b. Résultats (813).</i>	
2. Caractérisations	814
<i>a. Techniques (814). — b. Résultats (815).</i>	
III. — <i>Conclusions</i>	819
F. — SUBSTANCES POLYPHÉNOLIQUES	820
I. — <i>Caractérisation des polyphénols</i>	820
1. Dans l'Orobanche	820
2. Dans le Lierre	825
II. — <i>Isolement de l'acide chlorogénique</i>	825
1. Technique	825
2. Localisations	828
3. Relations avec le brunissement de l'Orobanche	828
4. Rôle physiologique	829
III. — <i>Conclusions</i>	831
G. — SUBSTANCES AZOTÉES	832
I. — <i>Répartition et évolution</i>	832
1. Techniques	832
2. Résultats	832
II. — <i>Caractérisation et évolution des acides aminés</i>	834
1. Techniques	834
2. Résultats	834
III. — <i>Conclusions</i>	839

CHAPITRE III. — ESSAIS DE CULTURE « IN VITRO » DE L'OROBANCHE DU LIERRE

841

A. — SUR DES TISSUS DE LIERRE	842
I. — <i>Culture in vitro des tissus de Lierre</i>	842
II. — <i>Essais de fixation de l'Orobanche sur les tissus du Lierre.</i>	846
B. — EN DEHORS DE LA PLANTE-HÔTE, SUR DES MILIEUX DÉFINIS	847
I. — <i>Essais de culture in vitro des graines d'O. Hederæ</i>	847
II. — <i>Essais de culture in vitro des tissus d'O. Hederæ</i>	848
C. — CONCLUSIONS	853

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

854

A. — GERMINATION	854
B. — FIXATION DE L'OROBANCHE SUR LA RACINE DE LIERRE	856
C. — ANATOMIE ET MORPHOLOGIE DE L'APPAREIL VÉGÉTATIF	858
D. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE	859
I. — <i>Les pigments</i>	859
II. — <i>Substances glucidiques</i>	860
III. — <i>Substances polyphénoliques</i>	860
IV. — <i>Substances azotées</i>	861
V. — <i>Considérations sur la nutrition de l'Orobanche</i>	861
E. — ESSAIS DE CULTURE <i>in vitro</i> DE L'OROBANCHE DU LIERRE	862

BIBLIOGRAPHIE	864
---------------------	-----

A mes Maîtres,

L. EMBERGER et J. SUSPLUGAS

*Avec l'hommage de ma vive gratitude et
de mon profond attachement.*

INTRODUCTION

Lorsque notre Maître, M. le Professeur EMBERGER, nous proposa comme sujet de recherche l'étude du parasitisme chez l'Orobanche du Lierre, nous étions loin de préjuger alors l'ensemble considérable de problèmes qui se présenteraient à nous.

La très riche bibliographie se rapportant à ces questions nous avait donné l'impression que peu de familles avaient été aussi étudiées que ces phanérogames parasites.

Si les problèmes germinatifs, très variables d'ailleurs en fonction des espèces, faisaient encore l'objet de recherches actives, les relations cytologiques entre l'hôte et le parasite paraissaient être nettement définies et ne pas mériter d'études particulières.

Seuls les problèmes d'ordre physiologique que posent la nutrition de ces plantes dépourvues de chlorophylle ne semblaient pas avoir été aussi bien élucidés.

Les travaux préliminaires que nous avons effectués nous ont convaincu que, malgré le nombre considérable de faits accumulés, il y avait dans nos connaissances sur l'organisation et la biologie des Orobanchacées quelques lacunes, bien des incertitudes et beaucoup de notions assez contradictoires.

Il semblait très difficile de se faire une conception satisfaisante des relations que ces parasites peuvent avoir avec la plante hôte.

Aussi avons-nous entrepris d'effectuer, dans la limite de nos moyens, un ensemble de recherches aussi bien anatomiques, morphologiques, biochimiques que physiologiques sur l'Orobanche du Lierre, dans le but d'apporter une première contribution synthétique sur ces problèmes.

Orobanche Hederæ Duby, objet de cette étude, est une des rares espèces d'Orobanche qui parasite presque exclusivement un seul hôte, le Lierre (*Hedera Helix* L.). Le Jardin des Plantes de Montpellier nous a fort heureusement fourni un matériel abondant.

L'exposé de nos résultats comprend quatre parties.

Dans un premier chapitre, nous envisageons les diverses étapes du cycle évolutif de l'Orobanche du point de vue cytologique et anatomique depuis la germination et la fixation du parasite sur la racine-hôte jusqu'au développement complet de la plante.

Le chapitre suivant est consacré à l'étude biochimique des deux partenaires.

Nous exposons dans le troisième chapitre les essais de cultures *in vitro* de l'Orobanche et, pour terminer, nous formulons les conclusions générales suggérées par nos recherches.

Mais, avant d'exposer les résultats de notre travail, qu'il nous soit permis d'exprimer ici les sentiments qui nous animent.

C'est tout d'abord à notre Maître, M. le professeur EMBERGER, membre correspondant de l'Institut, que nous voulons témoigner notre profonde reconnaissance.

Il nous a fait l'honneur de nous proposer cette étude et, malgré ses nombreuses obligations, n'a jamais cessé de nous guider dans nos recherches avec une inlassable bienveillance et une grande bonté, nous faisant profiter de l'incalculable avantage de sa haute compétence.

Qu'il veuille bien accepter l'hommage de cette thèse et recevoir ici l'expression de notre très profonde gratitude.

Au nom du professeur EMBERGER, c'est pour nous une grande joie que d'associer celui du professeur SUSPLUGAS.

C'est avec une vive émotion que nous voyons notre Maître nous juger aujourd'hui.

C'est lui qui nous a formé et animé de son enthousiasme et de sa foi. Nous lui devons le meilleur de nous-même.

En toute fidélité, que notre Maître veuille bien trouver ici l'hommage affectueux de notre attachement, de notre reconnaissance et de notre respect.

Au grand honneur que M. le doyen MATHIAS nous a fait en nous confiant cette année, sur la proposition de M. le professeur EMBERGER, une charge de cours à la Faculté des Sciences, s'ajoute celui de bien vouloir aujourd'hui présider le jury de cette thèse.

Nous avons été très profondément touché par cette haute marque de confiance et nous ne saurions assez l'en remercier.

Que M. le doyen MATHIAS veuille bien accepter ici l'expression de notre très profonde et très vive gratitude.

M. NOZERAN, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, nous a toujours témoigné la plus grande bienveillance.

Sans cesse, dans son laboratoire, nous avons reçu un accueil chaleureux. Les conseils qu'il nous a donnés, appuyés de sa profonde connaissance de la Physiologie végétale, ont été pour nous d'une aide fort précieuse.

C'est avec un très vif plaisir que nous le voyons siéger aujourd'hui à ce jury. Qu'il nous soit permis de lui témoigner notre très sincère et très vive reconnaissance.

Nous n'oublierons jamais la formation scientifique que nous avons reçue de nos Maîtres à la Faculté de Pharmacie et de la Faculté des Sciences, ni la bienveillante sollicitude qu'ils ont toujours manifesté à notre égard.

Qu'il nous soit permis de remercier, parmi eux, plus spécialement M. le doyen GIROUX, pour la haute marque d'estime qu'il nous a témoignée en

nous appelant, pour la première fois, à l'honneur d'un enseignement. Qu'il sache que nous ferons tout ce qui sera en notre pouvoir pour en être digne.

Nous devons beaucoup à M. CAMUS, professeur à la Sorbonne, qui, grâce à son extrême obligeance, nous a permis d'effectuer un séjour fructueux dans son laboratoire, nous initiant aux délicates techniques de culture des tissus végétaux.

Qu'il soit remercié de ses conseils avisés, qui ont facilité grandement nos recherches.

Nous sommes heureux de témoigner à M. LALAURIE l'expression très sincère de notre vive amitié, fruit de près de dix années de collaboration incessante.

Que M^{me} EY, M^{me} JANICOT, M. GOT et tous nos camarades du Laboratoire de Botanique et de Matière Médicale, dont le constant dévouement nous a permis d'effectuer ces recherches, acceptent nos très sincères remerciements.

Nous tenons enfin à exprimer notre cordiale sympathie à tous ceux, collègues ou amis, qui nous ont obligé au cours de ce travail. Nous assurons chacun de toute notre gratitude et en particulier MM. BONNET, MONNIER, GRANEL, ROUX, LUCK, M. et M^{me} DURAND et M^{lle} PARES dont les conseils et l'amitié ont été pour nous le meilleur des soutiens.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE BIOLOGIQUE DES DIVERSES ÉTAPES DU CYCLE ÉVOLUTIF DE L'OROBANCHE DU LIERRE

1^o *La germination.*

HISTORIQUE.

Les recherches sur la germination des graines des plantes parasites, et notamment des Orobanches, sont fort anciennes, et de nombreux botanistes en firent souvent leur principal sujet d'étude.

Le premier à avoir abordé cette question serait, en 1807, JAUME SAINT-HILAIRE, qui aurait vu germer des graines de ces végétaux, mais les jeunes plantes avaient péri avant qu'il eût pu les examiner à loisir.

VAUCHER fit paraître à Genève, en 1827, une importante *Monographie des Orobanches* résumant ses nombreux travaux antérieurs.

Il semait déjà depuis plusieurs années des graines d'Orobanche sans obtenir le moindre succès. Les graines se conservaient en bon état, mais ne donnaient aucun indice de germination. Il fut « des plus heureux, dit-il, lorsque, les plongeant dans l'eau, elles poussèrent alors ; surtout lorsqu'elles n'étaient pas bien mûres ».

Le botaniste genevois serait donc ainsi le premier à avoir vu la germination de cette plante parasite, et surtout à obtenir celle-ci en plongeant simplement les graines dans l'eau. Mais, par la suite, de nombreux chercheurs mirent fortement en doute cette affirmation.

En 1854, CASPARY, d'après ses propres essais de germination sur les racines de Chanvre avec des graines d'Orobanche rameuse, contesta la réalité de ces résultats.

En 1868, SOLMS-LAUBACH les qualifia de totalement erronés. KOCH, en 1887, dénia aussi complètement la valeur de ces essais, y vit trop de contradictions. Pour cet auteur, les germes de VAUCHER n'auraient été que des filaments de champignons établis sur les graines.

A la suite de KOCH, l'opinion généralement admise était que les graines d'Orobanches ne germaient que si elles se trouvaient au contact de la racine hôte.

Le problème de la germination des plantes parasites semblait encore loin d'être éclairci, quand BARTSINSKY, en 1932, ouvrit, par de nouvelles expérimentations, la voie à toute une série de recherches fructueuses.

Pour la première fois, en effet, la germination d'une Orobanche (*O.*

cumana Wallr.) fut obtenue hors de la présence des racines de la plante hôte, simplement au moyen d'extraits radiculaires de cette même plante.

Et, en 1938, CHABROLIN, en expérimentant sur des graines d'*Orobanche speciosa* DC. des extraits radiculaires de diverses légumineuses, entreprit l'étude de la substance stimulante excrétée. Il obtint de l'extrait aqueux de racines de la plante hôte un résidu sec qui, dissous dans l'eau, provoqua la germination de l'*Orobanche* de la Fève.

En 1951 et 1952, d'après ces données, BROWN, GREENWOOD, JOHNSON et LONG retirèrent, par adsorption sur charbon d'extraits de graines de Lin germées, un facteur stimulant la germination d'*Orobanche minor* Sutt. et en firent l'analyse par chromatographie. Il ne leur fut pas possible d'en déterminer exactement la nature chimique.

En 1952, BLANCHARD, étudiant la biologie de l'*Orobanche* de la Fève, conclut son étude en ces termes : « les essais de germination réalisés au laboratoire confirment que :

« a. Les graines d'*Orobanche*, abandonnées à elles-mêmes, sont incapables de germer, même quand elles sont placées dans les meilleures conditions d'humidité et de température ;

» b. Tout se passe comme si un principe existant dans les racicules de l'*Astragale*, du *Pois*, ou du *Lin*, principe contenu dans les solutions d'extrait radiculaire ou diffusant à partir des racicules, était indispensable à la germination des graines d'*Orobanche* » (loc. cit., p. 7).

La plupart des travaux effectués jusqu'à cette date tendaient tous à admettre l'impérieuse nécessité d'un stimulant, encore indéterminé, excrété par les racines hospitalières, pour déterminer la germination des graines du parasite ; lorsque IZARD et HITIER, en 1953, à l'Institut expérimental du Tabac à Bergerac, démontrèrent, pour la première fois, la possibilité d'obtenir la germination d'une *Orobanche*, *Phelypæa ramosa* (1), au moyen de substances chimiquement définies (nicotamide, pyridoxine et sels de magnésium).

Néanmoins, ces conditions ne semblaient pas pouvoir être généralisées, puisque d'autres auteurs, poursuivant de leur côté leurs recherches, concluaient toujours à la présence indispensable d'une racine hôte pour faire germer les graines d'*O. crenata* Forsk. = *O. speciosa* DC. (KADRY, 1956) et d'*O. cernua* (RAWAT, 1958).

IZARD, dans une courte note parue en 1957, va encore une fois révéler sur ce sujet des données encore inconnues : « un certain nombre de graines de *Phelypæa ramosa* sont susceptibles de germer spontanément sur eau pure, avec des conditions de culture paraissant assez strictes ».

Un an après, KRENNER fit paraître une longue étude sur la germination de l'*Orobanche* du Tournesol (*O. cumana* Wallr.) confirmant ces résultats.

(1) L'orthographe de *Phelypæa* est très variable suivant les auteurs : *Phelipæa*, VAN TIEGHEM (1891) et BECK-MANNAGETTA (1895) ; *Phelipæa*, IZARD et HITIER (1953) ; *Phelipæa*, HARBORNE (1958), etc.

Ce genre doit bien s'écrire *Phelypæa*, ayant été dédié à PHELYPEAUX DE PONTCHARTRAIN (cf. ROUY, *Flore de France*, 1909, XI, p. 157).

Enfin, IZARD et HITIER, en 1958, réussissaient, par l'intermédiaire de la gibberelline, à lever la dormance des graines de l'Orobanche du Tabac.

RECHERCHES PERSONNELLES.

1^o Étude morphologique et anatomique de la graine. — Avant d'envisager les phénomènes germinatifs en eux-mêmes et pour mieux les comprendre par la suite, nous avons entrepris l'étude cytologique et anatomique de la graine.

A. Morphologie. — Les graines d'Orobanche sont certainement, avec celles d'Orchidacées, parmi les plus petites graines qui existent. Dispersées sur une feuille de papier, elles présentent l'aspect d'une fine poussière.

Vues à la loupe, leur forme est ovale ou piriforme, rarement sphérique. L'extrémité de la zone micropylaire est plus rétrécie.

Les graines de l'Orobanche du Lierre ont comme dimensions moyennes 380 μ de long sur 260 μ de large.

Nous avons effectué les mêmes mensurations sur l'ensemble des graines que nous avons étudiées, afin d'essayer ainsi de différencier ces espèces (cf. Tableau I).

TABLEAU I. — DIMENSION MOYENNE DE QUELQUES GRAINES D'OROBANCHACÉES (1).

	LONGUEUR.	LARGEUR.
<i>Orobanche minor</i> Sutt.	310 μ	220 μ
<i>Orobanche Epithymum</i> DC.	360 μ	230 μ
<i>Orobanche Rapum</i> Thuill.	370 μ	240 μ
<i>Orobanche loricata</i> Reich.	380 μ	230 μ
<i>Orobanche Hederæ</i> Duby	380 μ	260 μ
<i>Orobanche cruenta</i> Bert.	380 μ	280 μ
<i>Phelypæa arenaria</i> Walp.	550 μ	370 μ

Seules les graines d'*Orobanche minor* et de *Phelypæa arenaria* peuvent se distinguer par une taille différente. D'autres éléments, et notamment l'ornementation du testa, peuvent aussi les caractériser comme nous le verrons par la suite.

Si leur taille est très petite, leur poids n'en est pas moins infime, puisqu'une graine pèse en moyenne trois millièmes de milligramme ; leur

(1) Les graines d'*O. minor* ont été prélevées sur des individus parasitant *Trifolium pratense* L. ; celles d'*O. Epithymum*, sur *Thymus vulgaris* L. ; *O. Rapum*, sur des buissons de *Genista purgans* L., dans le massif de l'Aigoual ; *O. cruenta*, sur diverses Légumineuses et *P. arenaria*, ainsi qu'*O. loricata*, sur des touffes denses d'*Artemisia campestris* var. *glutinosa* Gay.

Les graines d'*O. Hederæ* ont été récoltées sur des Lierres soit du Jardin des Plantes de Montpellier, soit de jardins particuliers.

nombre est tout aussi considérable : un individu moyen de 40 cm de haut peut disséminer, en fin de végétation, jusqu'à 165 000 graines.

D'autres espèces sont certainement encore plus prolifiques, puisque

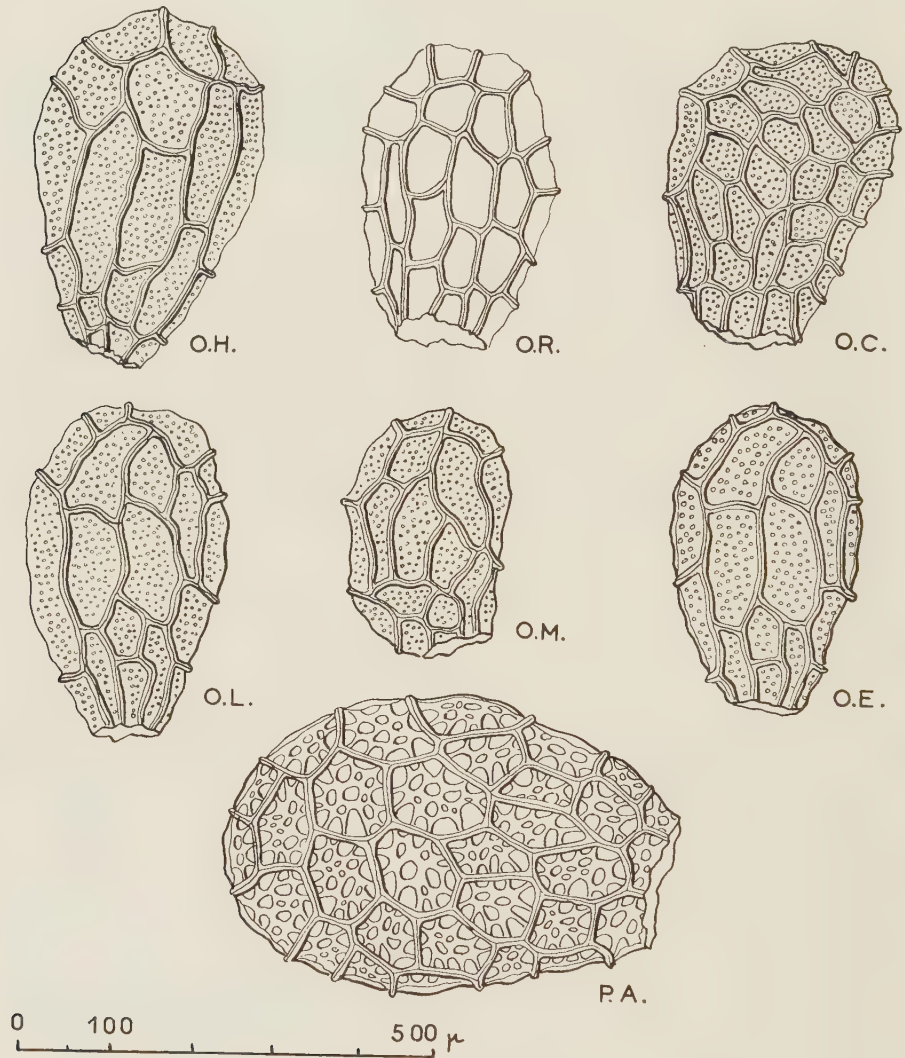


FIG. 1. — Aspect extérieur du testa de différentes graines d'Orobanche.

O. H. : *Orobanche Hederæ*; O. R. : *O. Rapum*; O. c. : *O. cruenta*; O. l. : *O. loricata*; O. m. : *O. minor*; O. E. : *O. Epithymum*; P. a. : *Phelypaea arenaria*.

BLANCHARD (1952, p. 20) évalue à 1 200 000 le nombre de graines qu'il peut y avoir sur un pied d'*Orobanche speciosa* DC.

Afin d'examiner plus facilement l'aspect extérieur des graines au microscope, nous les avons montées entre lame et lamelle directement dans une

solution d'hydroxyde de potassium à 5 p. 100. Ainsi les détails du testa apparaissent avec une certaine transparence et une grande netteté (fig. 1).

Le testa d'*Orobanche Hederæ* se présente sous la forme d'un laciis plus ou moins ondulé dessinant des réticulations assez proéminentes et parcourant toute la graine jusqu'à la région micropylaire. Ces réticulations sont nettement plus allongées dans le sens du grand axe de la graine dans la partie médiane. Cette particularité est à rapprocher de celle qu'on observe sur le testa d'*O. loricata*, *O. Epithymum* et *O. minor*. Elle n'est donc pas spécifique d'*O. cumana*, comme semblerait l'indiquer KRENNER (1958, p. 118). Il n'en est pas de même pour les graines d'*O. Rapum*, d'*O. cruenta* et de *Phelypæa arenaria*, dont les réticulations du testa sont sensiblement isodiamétriques.

La membrane basale de ces cellules possède une structure assez particulière. Dans la plupart des graines étudiées (*O. Hederæ*, *O. minor*, *O. cruenta* et *O. loricata*), cette membrane est ornée de très nombreuses perforations très régulières et assez fines, d'un diamètre moyen de 2 à 5 μ . Chez *O. Epithymum*, ces ponctuations sont plus larges et ont en moyenne 5 à 8 μ de diamètre. Ces membranes cellulaires trouées ne sont donc nullement caractéristiques d'une seule espèce d'Orobanche, comme le laisse entendre KRENNER (1958, p. 119). Les graines de deux espèces nous ont révélé une ornementation différente : dans *Phelypæa arenaria*, les perforations sont en forme de reticulum et dans *O. Rapum*, la membrane basale des cellules du testa est lisse, sans présenter aucun caractère particulier (fig. 1).

Nous pensons qu'une étude complète des graines de toutes les espèces d'Orobanche, qui n'a, à notre connaissance, jamais été entreprise jusqu'à présent, permettrait certainement, par la taille et l'ornementation du testa, d'aider à l'identification très délicate des échantillons d'herbier.

B. Anatomie et cytologie. — Afin d'étudier la structure anatomique et cytologique des graines d'*Orobanche Hederæ*, nous avons effectué tout d'abord des coupes dans des graines mûres en employant, pour en faciliter la manipulation, la technique de micro-inclusion de CHATTON (1927). Mais, le testa étant relativement dur et friable, les coupes obtenues étaient le plus souvent déchiquetées et difficilement interprétables. Nous avons, par la suite, utilisé comme matériel d'étude les ovaires eux-mêmes en différents états de développement. Ceci nous a permis de suivre les diverses étapes de la formation de la graine et de mieux préciser sa structure.

Vu la richesse des graines en matières grasses et en substances phénoliques, les fixateurs de Flemming à l'acide osmique, et de Regaud au formol-bichromate ne nous ont pas permis de faire une étude fine des constituants cellulaires. C'est le fixateur au picro-formol-alcoolique de Bouin-Dubosq-Brasil (B. D.) qui nous a donné les meilleurs résultats. Les préparations ont été réalisées suivant la technique habituelle d'inclusion à la paraffine et coupées au microtome à 7 ou 10 μ d'épaisseur. Nous avons employé comme colorant soit l'hématoxyline ferrique (H. F.), soit la safranine anilinée suivie de vert lumière saturé d'huile de girofle (S. V. L.).

a. *Structure générale.* — Les coupes effectuées dans de jeunes ovaires montrent des ovules recourbés, réfléchis sur eux-mêmes, donc nettement anatropes (fig. 2). Plus tard, d'ailleurs, la zone micropylaire se trouvera,

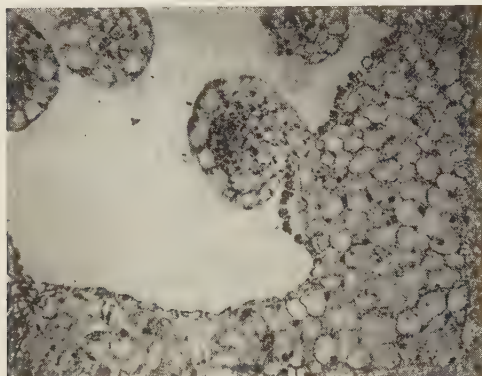


FIG. 2. — Coupe effectuée dans un ovaire d'*O. Hederæ*, montrant nettement la structure anatrophe des ovules. (B. D.-S. V. L.) $\times 130$.

dans la jeune graine, toujours, orientée vers le placenta (fig. 3). Une structure identique a été observée par TIAGI (1951, p. 168) pour les graines d'*Orobancha cernua* Lœffl. et d'*O. ægyptiaca* Pers. Néanmoins, KRENNER (1958, p. 122) décrit, au contraire, les ovules d'*O. cumana* et d'*O. ramosa* comme étant orthotropes.

Il est intéressant de signaler aussi qu'aucune trace de vascularisation ligneuse ou libérienne ne se trouve dans ces ovules.

b. *Le tégument et les tissus protecteurs de la graine.* — A la périphérie de l'ovule, on distingue un seul tégument entourant le nucelle. Les cellules de ce tégument vont arrêter leur division, s'agrandir d'une façon assez importante, épaissir et lignifier leur paroi et former le revêtement externe de la graine ou testa.

Cette lignification n'est pas complète et laisse apparaître, à travers la membrane basale, des perforations régulières très fines.

Ce tégument n'est pas directement appliqué contre les cellules de l'albumen, mais s'en trouve séparé par le nucelle qui forme une enveloppe interne composée de trois à quatre assises de cellules.

L'assise la plus interne épaissit assez fortement les membranes radiales et basales de ses cellules et, s'accolant fortement à l'albumen, servira à ce dernier de couche protectrice (cf. fig. 4).

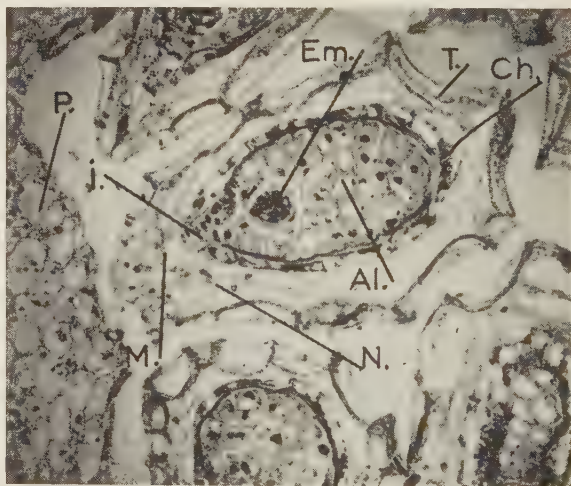


FIG. 3. — *O. Hederæ*. Même coupe. Détail d'une graine montrant la zone micropylaire (M) orientée vers le placenta (P).

T: testa; i: isthme; N: nucelle; Ch: chalaze; Al: albumen; Em: embryon (B. D.-H. F.) $\times 150$.

Lorsque la graine est complètement développée, les deux ou trois autres couches externes du nucelle, à membranes très fines, finissent par être comprimées. Elles sont alors difficiles à distinguer, quoique bien réelles. Ces observations concordent d'ailleurs avec celles effectuées par KADRY et TEWFIC (1956) sur les graines d'*O. crenata*.

La lignification du testa ne s'étend pas à la zone micropylaire qui reste, de ce fait, seulement protégée de l'extérieur par le nucelle. Ceci explique, sans doute, la difficulté que l'on a de stériliser efficacement ces graines, toujours abondamment souillées par des micro-organismes, sans en léser les parties vitales.

c. *L'albume*. — Directement sous la dernière assise de l'enveloppe nucellaire se trouve l'albume, dont les cellules les plus externes sont isodiamétriques et les membranes relativement plus épaisses (fig. 4). Cet épaissement externe restera plus tard fortement accolé à la membrane interne du nucelle pour ne simuler qu'une seule et même membrane.

Les cellules à cytoplasme dense se remplissent de substances lipidiques et de grains d'amidon avant que la graine ne se sépare du placenta.

Dans la région micropylaire, l'albume se termine par un isthme formé de deux rangées de cellules bordant de part et d'autre le canal micropylaire, cellules occupées en presque totalité par le noyau (fig. 3).

d. *Le corps embryonnaire*. — Le corps embryonnaire se présente comme une petite masse ovale très fortement colorée, ressortant vivement parmi les cellules de l'albume (fig. 3). Il est situé dans la partie supérieure de la graine, près de la région micropylaire.

Ses cellules de petite taille, à noyau très volumineux, sont homogènes et ne présentent aucune différenciation. On n'observe ni ébauche de cotylédon, ni radicule, ni gemmule, bien que KOCH (1878) ait mentionné de semblables formations dans les graines de cette même espèce.

Une étude extrêmement précise de l'embryologie d'*O. Hederæ* a été faite en 1942 par CRÉTE et reprise à nouveau par ce même auteur en 1955. Cette embryogenèse est typique (type Crucifères), mais s'arrête au stade pro-embryon (au sens de R. SOUÈGES).

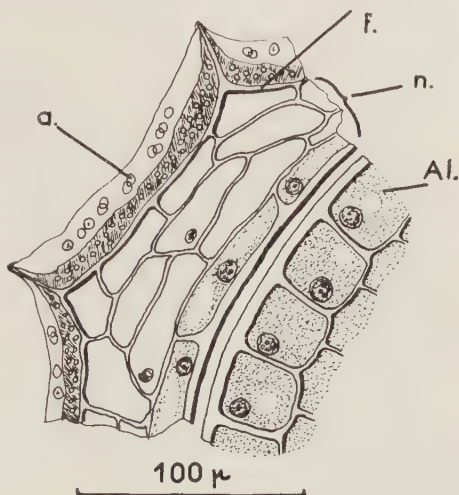


FIG. 4. — Coupe longitudinale d'une graine d'*O. Hederæ*.

t: testa; n: nucelle; Al: albume; a: amidon.

C. **Conclusions.** — En résumé : 1° les graines d'*Orobanche Hederæ* proviennent d'un ovule anatrope, à un seul tégument.

2° Les cellules de ce tégument s'agrandissent et se lignifient, sauf autour du micropyle, pour former le testa. Ce testa dessine un réseau réticulé et proéminent autour de la graine.

La membrane basale de ces cellules présente des perforations très fines et très régulières qu'on retrouve dans certaines espèces, alors que, dans d'autres, cette ornementation est très différente. Ce caractère, ajouté à la taille des graines et à l'aspect des réticulations, pourrait servir de critère pour une meilleure différenciation des échantillons d'herbier.

3° Le nucelle persiste sous forme de trois à quatre couches de cellules autour de l'albumen. Les assises externes très fines sont comprimées et difficilement visibles dans la graine mûre. La dernière assise épaissit fortement sa membrane basale et forme un revêtement protecteur intimement uni à la première assise externe de l'albumen.

4° L'albumen, formé de cellules assez régulières riches en amidon et en substances lipidiques, contient en son sein, vers la zone micropylaire, un pro-embryon non différencié.

2° Étude in vitro de la germination de l'*Orobanche du Lierre*. — D'après ce que nous avons vu précédemment, au moment où nous abordions notre étude (1954), la germination des Orobanches faisait toujours l'objet de recherches, sans que l'on puisse en généraliser les résultats.

Les problèmes germinatifs, déjà assez complexes pour un certain nombre de plantes autotrophes, paraissaient encore plus difficiles à résoudre chez les plantes parasites.

Les travaux de BARTSINSKI et de CHABROLIN avaient appris que, pour les graines de quelques espèces, le contact avec les racines de la plante hôte n'était pas nécessaire et que des extraits radiculaires déterminaient le même effet. Par la suite, IZARD et HITIER avaient démontré que, pour les graines de *Phelypæa ramosa* tout au moins, l'action stimulante de la racine-hôte pouvait être remplacée par certaines substances chimiquement définies.

Les observations que nous possédions au sujet de l'*Orobanche du Lierre* étaient rares : nous savions seulement d'après BECK-MANNAGETTA (1895) que « le contact avec un hôte approprié était une condition indispensable ».

Devant l'absence complète d'indication sur ce sujet, nous avons entrepris des essais préliminaires, en considérant tout d'abord ces graines comme si elles appartenaient à une plante autotrophe, c'est-à-dire en essayant de déterminer les facteurs température, lumière et humidité susceptibles de les faire germer naturellement.

Par la suite, nous avons poursuivi notre expérimentation en présence de racines de Lierre pour savoir si le contact des graines d'*Orobanche* avec ces racines était nécessaire, si le stimulant excrété suffisait, et qu'elle était sa nature.

Enfin, dans un troisième stade, nous avons recherché si, avec des sub-

stances douées d'une action trophique ou catalytique, nous n'obtiendrions pas des résultats identiques à ceux qui ont été publiés par les chercheurs de Bergerac au terme de leurs travaux sur l'Orobanche du Tabac.

A. Essais préliminaires. — Les graines d'Orobanche ont été déposées dans des boîtes de Petri contenant du papier filtre placé sur une mince nappe de coton, le tout maintenu constamment humide.

I. INFLUENCE DE L'IMBIBITION. — VAUCHER avait annoncé, en 1827, avoir fait germer des graines d'Orobanche rameuse en les submergeant simplement dans l'eau. Cependant, d'après le dessin qu'il donne de ces germes, on ne peut croire à la réalité de cette observation (cf. fig. 5).

C'est IZARD qui a été réellement le premier, en 1957, à constater qu'effectivement, sur des expériences portant sur plusieurs centaines de milliers de graines de *Phelypæa ramosa*, un certain nombre de celles-ci étaient susceptibles de germer spontanément sur eau pure, notamment au début de la belle saison et pendant l'été ; ce phénomène, qui est resté pour le moment inexpiqué, ne paraît pas lié à l'âge des semences (1958, p. 2659).

KRENNER a publié en 1958 des résultats identiques pour les graines de l'Orobanche du Tournesol (*O. cumana*), mais a fait au contraire de cette possibilité une question de maturité : « Les graines expérimentées l'année même de la récolte germent en nombre important (18 à 20 p. 100) dans de l'eau distillée, mais, l'année suivante, ces mêmes graines ne germent que sous l'effet des racines de la plante-hôte » (p. 116).

Ces deux résultats bouleversaient complètement la conception que l'on avait jusqu'à présent du caractère strictement hétérotrophe de la germination des Orobanchacées.

Nous avons donc réalisé de notre côté, avec les graines d'*O. Hederæ*, les mêmes expériences qu'IZARD et KRENNER, en faisant varier même l'origine de l'eau (calcaire, siliceuse ou distillée), sa température, la maturité, des graines, la saison.

Dans aucun de ces cas, nous n'avons observé de germination alors que les expériences de contrôle effectuées avec les mêmes lots et dans les mêmes conditions, mais en présence d'excrétions radiculaire du Lierre, furent, par contre, positives.

En dehors de l'Orobanche du Lierre, objet principal de notre étude, nous avons étendu les mêmes recherches aux graines d'*O. Epithymum*, *O. Rapum* et *O. loricata*, mais sans plus de succès.



FIG. 5. — « Une graine (d'Orobanche du Chanvre) commençant à germer, poussant des racines dans l'eau » in VAUCHER, 1827, Planche 16, fig. 1 et 2.

Par contre, nous avons obtenu, pour la première fois, la germination des graines de *Phelypæa arenaria* Walp. simplement en les humidifiant par de l'eau distillée (pH : 5,6).

Ces graines avaient été récoltées en juin 1957 et les germinations observées en décembre 1959, après le vingt-quatrième jour de la mise en traitement.

Ces résultats confirment donc ceux d'IZARD et de KRENNER pour les Orobanches du Tabac et du Tournesol, bien que les conditions germinatives n'aient pas été identiques.

Les graines de certaines espèces d'Orobanchacées ont donc bien la possibilité de germer spontanément dans l'eau pure, sans stimulant extérieur, tout comme des plantes autotrophes.

Cette autonomie germinative, qui ne se révèle que durant la première année de récolte pour *O. cumana* (KRENNER), ne paraît ni chez *P. ramosa* (IZARD), ni chez *P. arenaria* (PRIVAT) liée à l'âge des semences.

A notre connaissance, ce sont là les trois seules espèces dont pareil comportement ait été décrit jusqu'à présent.

II. INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE. — La température peut quelquefois être un facteur suffisant pour lever la dormance de certaines graines et notamment celles de Vanille qui, par la taille et la biologie, se rapprochent beaucoup des Orobanches. Une certaine température maintenue uniforme à 30° environ (alliée à des milieux nutritifs particuliers) suffit, d'après TONNIER (1952), à les faire germer.

Sur *O. Hederæ*, l'action de températures uniformes de 10, 15, 18, 20, 22, 26, 30 et 32°, d'alternances quotidiennes de 15 à 20° et de 15 à 25° ou d'un traitement prégerminatif à + 4° pendant des temps variables, n'ont donné aucun résultat.

III. INFLUENCE DE LA LUMIÈRE. — Nous avons recherché si ces graines ne présentaient pas une sensibilité particulière à la lumière comme, par exemple, celles de certaines Rhinanthées parasites (TOOLE et coll., 1956). Mais, de l'ensemble de nos expérimentations, il ressort que la lumière et la température ne paraissent pas être, sur les graines de l'Orobanche du Lierre, des éléments essentiels et suffisants pour permettre leur développement.

B. Étude de la germination de l'Orobanche du Lierre en présence des radicules de la plante-hôte. — I. TECHNIQUES EMPLOYÉES. — Cette étude a été le plus souvent réalisée, comme précédemment, en boîtes de Petri, sur un disque de papier filtre placé sur une nappe de coton imbibée d'eau distillée, le tout autoclavé à 120° pendant vingt minutes.

Les graines de Lierre ont été tout d'abord stérilisées après immersion des fruits pendant trente minutes dans de l'eau oxygénée à 11 volumes. En pressant ces fruits entre les doigts, nous avons expulsé les graines dans

une boîte de Petri, ce qui nous a donné, dans ces conditions, des germinations très rapides et sans souillures.

Trois jours après, nous avons déposé les graines d'Orobanche avec une anse de platine flambée près des radicules stimulantes.

Nous avons employé dans la plupart des cas le Lierre, mais aussi quelquefois le Lin, le Pois et le Pois-chiche, qui stimulent de façon importante la germination de certaines Orobanches (CHABROLIN, 1935).

Ces différentes graines ont été alors stérilisées séparément par contact de quinze à vingt-cinq minutes, dans une solution extemporanée à 120 g par litre d'hypochlorite de calcium à 110° chlorométriques. Après décanation et lavage rapide, nous les avons disposées avec des pinces flambées dans les germoirs.

Pour ces dernières espèces, nous avons employé parfois la technique de BLANCHARD (1952) avec d'excellents résultats, bien que l'observation en soit peu commode : à l'intérieur d'un pot de sable de Fontainebleau, nous avons déposé les graines d'Orobanche entre deux rondelles de papier filtre sur une plaque de verre.

Les graines des plantes stimulantes ont alors été mises à germer près de la surface du pot et leurs radicules, en se développant, ont percé le papier, venant s'étaler au contact ou à proximité des graines du parasite et déclenchant ainsi leur germination.

II. ESSAIS PRÉLIMINAIRES EN PRÉSENCE DES RADICULES DE LA PLANTE-HÔTE. — a. *Récoltes des graines*. — Un élément très important dans l'étude des germinations est celui des conditions de récolte des graines.

La période qui se révèle la plus favorable se situe entre les mois de mai et de juillet. Les hampes florales de l'Orobanche sont alors en plein épanouissement, avec, à la base, des fruits déjà mûrs et prêts à s'ouvrir. Les pieds sont arrachés, transportés au laboratoire et disposés sur des feuilles de papier. La partie terminale de la hampe est éliminée et on ne conserve que les quatre ou cinq rangées de fruits de la base qui sont parvenus les premiers à maturité. Ces fruits sont d'ailleurs nettement plus volumineux que ceux qui se développent par la suite sur l'axe et le pouvoir germinatif de leurs graines est très souvent supérieur à celui des graines prélevées dans les capsules du sommet. Ces fruits sont mis à sécher à la température du laboratoire, et, au bout de six à huit jours, on recueille les graines tombées d'elles-mêmes sur le papier.

Afin d'avoir en expérimentation des lots homogènes, ces graines sont passées entre deux tamis aux mailles ayant respectivement 0,500 mm et 0,250 mm d'intervalle. Les graines d'une taille inférieure à 250 μ , mal formées et qui n'ont qu'un taux germinatif très faible, sont ainsi éliminées ; le tamis le plus gros arrête les débris végétaux (1).

(1) Nous nous sommes donc efforcé d'opérer dans les meilleures conditions possible, sur des graines dans un état métabolique voisin. Nous devons néanmoins préciser que les récoltes ont été effectuées sans contrôle génétique préalable. Cela est assez difficilement réalisable, car ces graines ne peuvent être obtenues en quantité suffisante que d'une large population et seulement pendant une courte période de l'année.

Les graines que nous avons, au début de nos essais, récoltées au mois de septembre, octobre ou novembre, sur des Orobanches, ayant donc été soumises aux très fortes chaleurs de l'été, ont toujours germé très difficilement et quelquefois pas du tout, malgré les conditions germinatives optimales dans lesquelles elles étaient placées (cf. tableau II).

Une élévation importante de la température se révèle donc, pour l'Orobanche du Lierre, un des éléments déterminant ou accentuant la dormance de ces graines.

Les mêmes observations ont été faites non seulement avec les graines d'*O. Hederæ*, mais aussi avec celles d'*O. minor* et *O. Epithymum*. Toutefois, les graines d'*Orobanche loricata* récoltées au mois de septembre 1957, à 150 m du bord de la mer, ont germé par la suite au contact de graines de Lin, en janvier 1958.

TABLEAU II. — POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES D'« OROBANCHE HEDERÆ » EN FONCTION DE LA PÉRIODE DE RÉCOLTE. (Germinations effectuées en présence de radicules de Lierre et observées le 14^e jour.)

PÉRIODE DE RÉCOLTE.	DATE DE MISE EN GERMINATION.	POURCENTAGE DE GERMINATIONS OBSERVÉES.
Juin 1955	25 septembre 1957	38
Décembre 1955	—	0
Juillet 1956	—	43
Septembre 1956	—	0

b. *Conservation des graines.* — En parcourant la bibliographie concernant les plantes parasites et hémiparasites, nous nous sommes aperçu que, pour certaines espèces du moins, l'état de conservation des graines était un facteur important influant sur la germination.

GAUTIER (1908), dans une note « sur le parasitisme de *Melampyrum pratense* », insiste fortement sur l'impossibilité que l'on a de faire germer ces graines conservées à l'état sec : « Nombreux sont les expérimentateurs qui se sont heurtés à cet insuccès. Moi-même je n'ai pas non plus réussi à faire germer les graines que j'avais récoltées durant l'été, à la déhiscence du fruit et soigneusement renfermées dans des sacs en papier » (*loc. cit.*, p. 68). Au contraire, ces mêmes graines, conservées sur un substratum maintenu constamment humide, deviennent aptes à germer au bout de quelque temps. Ces résultats sont en accord avec les très nombreux travaux effectués par HEINRICHER (1909) : « J'ai remarqué que, depuis des années, j'essayais d'obtenir la germination des *Thesium* en partant des graines et ne pouvais avoir de succès qu'en ensevelissant dans le sol les fruits fraîchement cueillis. Les graines sèches perdent immédiatement leur pouvoir germinatif » (*loc. cit.*, p. 333).

Dans nos propres expériences, les graines d'Orobanche, une fois tombées

de la capsule et tamisées, sont mises dans des récipients en verre obturés par un tampon de coton et conservés dans une chambre froide à une température constante de $+ 4^{\circ}$ C. Si cette basse température n'empêche pas, à proprement parler, l'installation de la dormance, elle conserve néanmoins l'énergie germinative à peu près constante en toutes saisons (cf, tableau III), et ce, non seulement l'année même de la récolte, mais

TABLEAU III. — POUVOIR GERMINATIF DES GRAINES D'« OROBANCHE HEDERE », CONSERVÉES A UNE TEMPÉRATURE DE $+ 4^{\circ}$ DÈS LE MOMENT DE LA RÉCOLTE. (Graines récoltées en juillet 1956, germinations effectuées en présence de racicules de Lierre.)

DATE DE MISE EN GERMINATION.	POURCENTAGE DE GERMINATIONS OBSERVÉES AU 20 ^e JOUR.
25 septembre 1957	43
30 octobre 1957	48
14 novembre 1957	43
22 janvier 1958	47
24 mars 1959	54
16 mai 1959	39

aussi deux, trois ou même cinq ans après. Des études récentes de DAVID (1957) et ALLEN (1957) confirment d'ailleurs ces résultats.

Quelques observations sur la viabilité des graines d'Orobanche ont déjà été faites : les graines de *Phelypæa ramosa* peuvent conserver dans le sol leur faculté germinative pendant de nombreuses années (IZARD et HITIER, 1953, p. 47) et celles d'*O. crenata* sont capables de rester viables, enterrées pendant plus de dix ans (KADRY et TEWFIC, 1956 a, p. 274) ; mais ces observations n'avaient jamais été faites dans des expériences *in vitro*.

c. *Influence de la température.* — Dans nos conditions expérimentales, et avec notre propre matériel, à des températures au-delà de 25° , nous n'avons jamais observé de germinations. Ceci confirme d'ailleurs les observations faites précédemment sur l'accentuation de la dormance des graines récoltées après les fortes chaleurs de l'été.

C'est en plaçant nos boîtes de Pétri à l'étuve à 22° , ou à la température du laboratoire, dans un lieu où celle-ci est peu variable (19° à 22° C), que nous avons obtenu les meilleurs résultats. La plupart des auteurs opèrent d'ailleurs avec des conditions assez voisines. IZARD et HITIER laissent leurs germoirs à l'étuve à 22° - 24° pour les graines de *Phelypæa ramosa*. Dans des expériences récentes, RACOVITZA (1959) soumet les graines de *P. ramosa* à des températures, variant de 21° à 24° et d'autres de 16 - 18° à 24° . Cette variation de température quotidienne de 6 à 8° s'est montrée, dans ce cas, la plus favorable. Néanmoins BROWN et ses collaborateurs (1951 a) opèrent, pour les graines d'*O. minor*, à une température optimale de 26° . Mais il est évident que la température, qui peut d'ailleurs différer

suivant les espèces, dépend aussi de la maturité des graines et de leur conservation.

d. *Influence de l'imbibition.* — Personnellement, dans la plupart des essais de germination, nous avons, le plus souvent, fait subir aux graines un prétraitement en milieu humide pendant une dizaine de jours, ce qui a eu pour effet d'augmenter à la fois le pourcentage et la rapidité de germination ; les graines ont été, pour cela, mises dans des petits sachets de papier filtre et déposées sur du sable humide. Ceci n'était toutefois pas indispensable, car nous avons obtenu des germinations avec des graines sans prétraitement. Cette constatation avait d'ailleurs été faite déjà par CHABROLIN (1938) et, par BROWN (1951 a), pour l'Orobanche du Trèfle.

Par la suite, les boîtes en expérience ont été maintenues avec un taux d'humidité constant, mais nous avons observé quelquefois, dans des boîtes humidifiées normalement puis abandonnées par la suite à la dessiccation, des pourcentages de germination assez élevés après une nouvelle imbibition et en présence d'une substance stimulante.

Un état d'humidité variable influe souvent sur le pouvoir germinatif de certaines espèces (BINET, 1958).

Les expériences de WENT (1953), corroborées par celles d'OPPENHEIMER (1959), confirment d'ailleurs l'importance d'une imbibition optimale des graines, au-delà de laquelle, la germination est entravée, par entraînement, non seulement de substances inhibitrices, mais aussi de certains facteurs de croissance indispensables.

e. *Influence de la lumière.* — La plupart de nos expérimentations ont été effectuées en laboratoire en lumière diffuse. Un ensemble d'expériences réalisées à l'obscurité nous a montré qu'il n'y avait pas de différences significatives dans les pourcentages observés. Les graines d'*Orobanche Hederæ* n'ont donc pas le même comportement que celles d'une autre plante parasite (*Striga hermonthica*) dont la germination est inhibée par la lumière (TOOLE, 1956).

Les essais effectués tout récemment par IZARD et HITIER (1958) avec des graines de *P. ramosa* d'un même lot, les unes éclairées huit heures sur vingt-quatre (1 700 lux), et les autres restant à l'obscurité, indiquent dans l'une et l'autre condition des taux de germination presque identiques.

L'action de la lumière est donc assez peu sensible.

III. INFLUENCE DU STIMULANT SÉCRÉTÉ PAR LES RACINES DU LIERRE. — D'après toutes les observations faites précédemment concernant les facteurs température, imbibition et lumière, nos conditions opératoires ont été les suivantes : dans les boîtes de Pétri, contenant du papier filtre imbibé par 10 ml d'eau distillée, sont déposées les graines de Lierre, puis, trois jours plus tard, les graines d'Orobanche. Ces boîtes sont mises en lumière diffuse, soit à l'étuve, à une température constante de + 22°, soit

à la température du laboratoire (+ 19 à 22°). Dès le lendemain, la majorité des graines de Lierre commencent à germer et, dans les jours qui suivent, développent leurs radicules et leurs feuilles cotylédonaire.

1° *Étude de l'énergie germinative.* — Entre le septième et le dixième jour, les premières germinations d'Orobanche apparaissent et s'échelonnent ensuite jusqu'au trente-cinquième jour, où l'on observe encore des filaments germinatifs sortant à peine de la zone micropylaire.

Les taux de germination les plus élevés se situent généralement entre le quinzième et le vingtième jour (cf tableau IV).

TABLEAU IV. — ÉNERGIE GERMINATIVE DES GRAINES D'« OROBANCHE HEDERÆ » SOUS L'INFLUENCE DES SÉCRÉTIONS DE RACINES DE LIERRE. (Expériences effectuées en mars 1959 avec des graines récoltées en juillet 1956. Nombre de graines mises en germination : 300. Numérations effectuées à une distance inférieure à 5 mm des racines stimulantes.)

NOMBRE DE JOURS APRÈS LA MISE EN GERMINATION.	NOMBRE DE GRAINES GERMÉES.	POURCENTAGE DES GRAINES GERMÉES.
6	0	0
7	8	2,7
8	21	7
10	47	15,7
12	61	20,2
15	125	41,7
20	163	54,3
25	175	58,3
30	181	60,3
35	186	62
40	186	62

2° *Influence de la distance de la graine par rapport à l'hôte sur le pouvoir germinatif.* — Les germinations observées ont lieu près de la racine du Lierre et au niveau de la zone pilifère. Les pourcentages de germination sont, en outre, plus élevés près du collet que vers le sommet de la racine. La substance stimulante est donc bien excrétée par les poils absorbants.

Cette stimulation dans le cas du Lierre est, de plus, assez importante puisqu'on observe encore des germinations jusqu'à une distance de 16 mm des poils radiculaires de la plante-hôte (cf tableau V). Le maximum d'intensité se situe néanmoins dans la zone la plus proche des poils radiculaires.

Le pouvoir stimulant du Lierre agit d'ailleurs à une distance supérieure à celle indiquée par certains auteurs pour d'autres espèces. Ainsi, les sécrétions radiculaires de *Carum ajowan* Benth. et Hook. peuvent agir jusqu'à une distance maximale de 5 mm sur les graines de *O. ramosa* (RACOVITZA, 1958), et l'action des radicules qui stimulent la germination d'*O. speciosa* ne dépasse pas une zone de 10 mm autour de la racine (CHABROLIN, 1935).

Un autre point important à signaler est la période de diffusion de ce principe stimulant : dès que les poils se forment sur la racine du Lierre, on assiste aux premières germinations.

KADRY et TEWFIC (1956 *a*, p. 278), dans leurs études sur la germination

TABEAU V. — INFLUENCE DE LA DISTANCE ENTRE LES RACINES DE LIERRE ET LES GRAINES D'« OROBANCHE HEDERÆ » SUR LEUR POUVOIR GERMINATIF. (Graines récoltées en juillet 1956, mises en germination en mars 1959. Résultats observés 15 jours après.)

DISTANCE EN MILLIMÈTRES.	NOMBRE TOTAL DE GRAINES.	NOMBRE DE GRAINES GERMÉES.	POURCENTAGE DES GRAINES GERMÉES.
0-2	58	49	86
2-4	48	30	62
4-6	40	15	37
8-10	54	12	22
10-12	46	7	15
12-16	53	3	6
16-18	37	0	0

d'*O. cruenta*, avaient observé que les graines de cette espèce, mises au contact de jeunes racines de *Vicia Faba* semées trois jours auparavant, n'entraient en germination qu'une semaine avant la floraison de l'hôte. Dans leurs très nombreuses expériences, s'étendant du mois de novembre au mois d'avril, la germination de l'Orobanche s'effectue toujours six à sept jours avant que les pieds de Fève ne fleurissent.

Nos propres expérimentations avec les graines d'*O. Hederæ*, et par la suite avec *O. Rapum*, *O. Epithymum*, *O. loricata*, *O. minor* et *Phelypæa arenaria*, montrent que le stimulant nécessaire à la germination de ces graines est sécrété bien avant la floraison de la plante-hôte, quelques jours à peine après l'apparition des feuilles cotylédonaire, ceci pour le Lierre, aussi bien que pour le Lin, le Pois et le Pois chiche. Nous n'avons jamais observé personnellement, pour les espèces étudiées, qu'il faille attendre une semaine avant la floraison de la plante nourricière pour que les graines du parasite germent.

Tout cela prouve donc, malgré l'affirmation de BECK-MANNAGETTA, que le contact avec la racine-hôte n'est point indispensable pour amener la germination d'*O. Hederæ*, puisque celle-ci se produit à une distance de près de 16 mm des racines du Lierre. D'autre part, l'action stimulante du ou des produits sécrétés par la racine du Lierre, persiste un certain temps puisque, si l'on dépose des graines d'*Orobanche Hederæ* dans une boîte de Pétri ayant auparavant contenu des plantules de Lierre, un certain nombre de graines germent dans la zone où se trouvaient les radicules de la plante-hôte.

3° *Essais d'extraction des substances stimulantes.* — Voulant aller plus loin dans nos recherches, nous avons réalisé un certain nombre d'essais pour extraire ce stimulant et étudier sa nature.

Nous nous sommes adressés, soit à l'eau de germination de plantules de Lierre, soit à un extrait préparé à partir d'un broyat de racicules de cette plante.

Une centaine de graines de Lierre ont été mises à germer dans une gaze déposée à la surface d'une grande boîte de Pétri pleine d'eau distillée. Les graines ont germé et leurs racicules, pénétrant dans l'eau, y ont laissé diffuser les substances excrétées.

Quand les racicules ont atteint 4 à 5 cm, l'eau de germination a été recueillie et concentrée sous vide à un volume de 10 ml et à une température inférieure à 50°. Cet extrait a induit la germination des graines d'Orobanche, mais à un taux qui ne dépasse pas 5 p. 100 et, un mois après, malgré sa conservation à basse température, il a perdu toute activité.

Pour réaliser des extraits radiculaires, nous avons suivi la même méthode que CHABROLIN (1938) : 5 g de jeunes racicules de Lierre sont broyées au mortier avec 100 ml d'eau distillée et le filtrat concentré au B. M. Mais cet extrait n'a manifesté aucune activité sur notre espèce.

La substance active sur la germination de l'Orobanche du Lierre n'existerait donc pas préformée dans la racine de la plante-hôte ? Il se peut aussi que des extraits radiculaires préparés dans d'autres conditions expérimentales, lyophilisation par exemple, conduisent à de meilleurs résultats.

L'eau de germination s'étant révélée seule active, nous avons entrepris son étude chimique, au moyen de la chromatographie sur papier.

La recherche des acides organiques ne nous a pas donné de résultats interprétables ; par contre, les chromatogrammes ont révélé avec netteté la présence, dans les excrétions radiculaires du Lierre, d'acides aminés parmi lesquels l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine et la leucine.

Les études effectuées par CARRÉ et DEHAY (1957, 1958 et 1959) sur les excrétions radicellaires d'un certain nombre de plantes, montrent que cette diffusion de substances acides par les racines de plantes en germination est un phénomène général. Le maximum d'excrétion se situe aux environs du sixième jour de culture. Or, c'est bien après le sixième jour que la germination des graines d'Orobanche est stimulée par le Lierre.

Nous avons tenu compte de ces résultats dans nos essais ultérieurs en présence de substances chimiques définies.

BROWN et ses collaborateurs ont étudié très longuement la nature de la substance excrétée par les racines de Lin et stimulant hautement la germination des graines d'*O. minor*.

Cette substance ne serait, ni un hydrate de carbone, ni un acide aminé ; ses propriétés suggéreraient la présence, dans sa molécule, d'une fonction lactone avec des doubles liaisons conjuguées. Mais, malgré le nombre considérable de techniques mises en œuvre, il n'a pas été encore possible de l'isoler à l'état pur, ni de préciser exactement sa structure chimique.

4° *Spécificité du stimulant.* — La famille des Orobanchacées comprend un ensemble d'espèces morphologiquement très proches et dont beaucoup sont d'ailleurs assez difficilement différenciables.

Néanmoins, certaines sont très strictes du point de vue parasitisme et ne s'attachent qu'à un seul hôte ou à une seule famille. D'autres peuvent, au contraire, se fixer sur un nombre considérable de plantes appartenant à des familles très diverses.

Deux questions peuvent se poser :

— Retrouve-t-on dans le comportement de leurs graines les mêmes conditions de spécificité qu'elles ont vis-à-vis de la plante hospitalière ?

— Cette spécificité vis-à-vis de l'hôte, est-elle fonction du ou des facteurs indispensables à la graine pour germer ?

Un certain nombre d'éléments nous sont déjà connus.

Quelques Orobanches paraissent très souples au point de vue stimulation : ainsi des graines d'*O. speciosa* peuvent germer sous l'influence des sécrétions radiculaires de près de soixante-quinze espèces de phanérogames appartenant à des familles très diverses : Légumineuses, Composées, Ombellifères, Linées, Scrofulariacées, Cannabinacées, Valérianacées, Liliacées, etc. (CHABROLIN, 1935).

D'autres, au contraire, ne répondent qu'à des conditions assez étroites : ainsi *O. cumana* n'est sensible qu'aux sécrétions de sa plante-hôte, le Tournesol, et faiblement aux racines du Lin (KRENNER, 1958, p. 116). Cet auteur a essayé vainement de faire agir les radicules d'un nombre considérable de plantes (Pois, Blé, Chou, Ricin, Chanvre, Tabac, Trèfle, Tomate, etc.) sur des graines d'Orobanche du Tournesol, et ce quel que soit l'état de maturité de ces graines.

Par ailleurs, les sécrétions radiculaires de *Carum ajowan* Benth. et Hook., qui stimulent d'une façon importante les graines de *Phelypæa ramosa*, sont sans effet sur les graines d'*O. cumana* et sur celles d'*O. Brassicæ* Novopokrovsky (RACOVITZA, 1958).

Nous-même, dans nos propres expérimentations, avons constaté que les jeunes racines de Lierre peuvent induire la germination des graines d'*O. minor* avec presque autant d'intensité que celles d'*O. Hederæ*. Par contre, elles stimulent faiblement celles d'*O. loricata* et d'*O. Rapum* et sont sans action sur les graines de *Phelypæa arenaria* et d'*O. Epithymum*.

D'autre part, nous avons obtenu la germination des graines de l'Orobanche du Lierre non seulement par l'intermédiaire des sécrétions de son hôte le Lierre, mais avec le Lin, le Pois et le Pois-chiche, qui ne sont d'ailleurs jamais parasités.

On ne retrouve donc pas dans le comportement des graines la même spécificité qui existe dans le choix de l'hôte :

— L'Orobanche de la Fève, qui ne se fixe que sur des Légumineuses annuelles, germe sous la stimulation de racines de familles très diverses ;

— L'Orobanche du Lierre, qui ne s'attache presque exclusivement qu'à une seule espèce, peut germer sous l'influence des sécrétions de plusieurs autres plantes.

On ne peut donc affirmer que la spécificité d'une plante parasite pour un hôte dépende essentiellement du facteur particulier et nécessaire à la graine pour germer.

Il y a là, vraisemblablement, deux problèmes distincts : il faut, pour qu'une Orobanche parasite une plante déterminée, non seulement que cette dernière soit capable de stimuler sa germination, mais aussi que l'Orobanche puisse y pénétrer et s'y fixer.

Cette dernière condition est encore à préciser.

Nous ne pensons pas d'ailleurs que l'on puisse, à partir d'un extrait radiculaire d'une plante donnée, ou à partir d'une substance déterminée, dans les conditions expérimentales normales, obtenir d'une façon constante la germination de toutes les graines des diverses espèces d'Orobanche.

La spécificité d'un hôte et d'une espèce parasite donnés résulte non seulement des conditions de milieu, de la nature et de la quantité des substances excrétées susceptibles de déterminer la germination de ces plantes parasites (IZARD, 1953), mais aussi, certainement, de facteurs encore inconnus rendant possible la pénétration et la fixation de l'Orobanche sur son hôte.

C. Étude de la germination de l'Orobanche du Lierre en présence de substances chimiquement définies. — L'étude que nous avons entreprise précédemment sur la germination de l'Orobanche du Lierre en présence soit de radicules, soit d'extraits radiculaires de la plante-hôte, nous a permis de préciser un certain nombre de conditions nécessaires, ou favorisant, tout au moins, cette germination, mais sans toutefois parvenir à déceler exactement la nature même de ce stimulant sans lequel, jusqu'à présent, la germination d'*O. Hederæ* n'avait pu avoir lieu.

Cette stimulation naturelle ne pouvait-elle être remplacée par des substances nettement définies agissant soit sur les téguments de la graine, soit sur l'embryon ?

La dormance encore mystérieuse de ces graines parasites pose là un difficile problème.

Plusieurs hypothèses peuvent venir à l'esprit. On peut tout d'abord penser que, semblablement à beaucoup d'autres graines de plantes autotrophes, les enveloppes tégumentaires, de par leur texture et leur constitution, opposent une perméabilité insuffisante à l'oxygène ou à l'eau. Et nous avons déjà vu que cette question de l'imbibition de la graine d'Orobanche est certainement très importante, puisqu'un prétraitement humidifiant accroît, d'une façon sensible, le pouvoir germinatif et que, d'autre part, dans certaines conditions mal définies et pour quelques Orobanches seulement, l'eau est un facteur suffisant pour amener la germination.

On peut supposer aussi que c'est au niveau même de l'embryon que réside cette dormance, soit qu'il faille, pour déterminer son développement, des conditions particulières de milieu (zone de pH très étroite par exemple), ou qu'il manque à cet embryon, de par sa nature même de tissu de plante

parasite, un élément métabolique essentiel qui, par atrophie parasitaire, lui ferait défaut.

Cet élément métabolique pourrait être, *a priori*, soit une molécule entrant directement dans un cycle de réaction (sucre, acide aminé, acide organique), soit un biocatalyseur d'origine vitaminique ou minérale, nécessaire au déclenchement d'un cycle bloqué.

On peut enfin formuler une dernière hypothèse : la dormance embryonnaire de la graine d'Orobanche résulterait d'une concentration trop élevée dans ses tissus d'un inhibiteur de croissance et la substance stimulante excrétée par les racines de l'hôte déterminerait la disparition de cet inhibiteur.

Dans les recherches que nous avons parallèlement entreprises dans le cours de cette étude sur le biochimisme de l'Orobanche du Lievre, nous avons isolé et caractérisé dans ses divers tissus un composé polyphénolique, l'acide chlorogénique, qui paraît jouer, dans le métabolisme de cette plante parasite, un rôle assez important (PRIVAT, 1959).

En dehors de son action dans le métabolisme des flavones et des anthocyanes, cet acide pourrait se comporter aussi, dans certains cas, comme inhibiteur de croissance (SHIBOAKA et IMASEKI, 1957).

Bien des hypothèses peuvent être alors formulées : cet inhibiteur pourrait se trouver simplement dans les fragments microscopiques de tissus d'Orobanche accompagnant les graines dans leur mise en germination, tissus d'ailleurs riches en acide chlorogénique, comme nous l'avons vérifié. L'immersion dans l'eau, ainsi que la pratique KRENNER, permettrait de l'éluer.

Ou bien, si cet inhibiteur existait réellement dans les tissus de la graine, un cycle de réaction pourrait se produire qui le transformerait en substance de croissance.

En effet, tout récemment, PILLET et COLLET (1959) ont montré qu'un composé voisin, l'acide férulique, agirait exactement comme l'acide gibberellique.

On peut alors penser qu'il suffirait de déclencher soit par des vitamines, soit par des biocatalyseurs, l'hydrolyse de l'acide chlorogénique (inhibiteur) en acide quinique et acide caféique, et ce dernier acide, par simple méthylation, donnerait directement l'acide férulique (facteur de croissance).

Nous avons examiné ces diverses hypothèses et avons essayé, en utilisant un certain nombre de substances, d'agir soit sur les téguments, soit sur l'embryon lui-même afin de lever cette dormance de nature encore inconnue.

I. TECHNIQUES. — Nous avons réalisé, comme précédemment, la plupart de nos essais de germination en boîte de Pétri. Néanmoins, nous avons quelquefois, devant le nombre important de substances à étudier, employé différents procédés et notamment la « technique en goutte pendante » de BROWN (1951 *a*), assez pratique pour bien observer la germination de graines si petites, ce qui nous a d'ailleurs donné de bons résultats.

On utilise pour cela deux plaques de verre rectangulaires de 13 × 18 cm que l'on sépare l'une de l'autre de 3 à 4 mm, au moyen de paraffine coulée sur les bords. Sur la base de la plaque supérieure, on trace avec un crayon paraffiné un quadrillage pour empêcher les gouttes de se toucher. On peut ainsi essayer en même temps un très grand nombre de substances à des concentrations différentes sur les graines que l'on dépose dans chaque carré du quadrillage avec une anse de platine flambée. De cette façon, on agglomère, en moyenne, 20 à 40 graines dans chaque goutte.

Dans certains cas, nous avons essayé la méthode de RAINES (1937) qui permet une imbibition régulière et renouvelée des graines : une feuille de papier filtre sur laquelle sont déposées les graines d'Orobanche est placée entre deux plaques de verre maintenues à une distance de 3 à 4 mm l'une de l'autre et disposées en position inclinée. La substance à étudier est soit amenée par un goutte-à-goutte au sommet de la feuille, soit simplement placée dans une boîte de Pétri à sa base ; le liquide, montant par capillarité, maintient un taux constant d'humidité.

Pour certains essais nécessitant des substances devant obligatoirement être stérilisées, comme les sucres, nous avons fait appel aux techniques classiques en tube incliné employées pour la germination des graines d'Orchidacées.

Les produits à étudier, incorporés dans un milieu gélosé à 13 g p. 1000, sont répartis en tubes stérilisés à l'autoclave à 120° pendant vingt minutes et inclinés pour laisser prendre la gélose. Les graines sont alors déposées uniformément sur la surface de la gélose avec une anse de platine flambée.

II. ESSAIS EFFECTUÉS POUR LEVER UNE DORMANCE TÉGUMENTAIRE. — La dormance des graines d'Orobanche pourrait être due, pensions-nous, à une perméabilité insuffisante des téguments à l'oxygène ou à l'eau.

Nous avons précédemment étudié la constitution des différentes enveloppes de la graine. Il ne semble pas que le testa, de par ses pores, puisse être une barrière aux échanges des gaz et de l'eau. Il fait d'ailleurs défaut dans la région micropylaire. Néanmoins, le nucelle, étroitement appliqué contre la paroi externe de l'albumen, forme une protection assez épaisse autour de ce dernier.

Nous avons tout d'abord procédé à quelques essais de scarification au moyen d'acide sulfurique à diverses concentrations et à des temps de contact variables. BERTOSI (1955) réussit par ce moyen à obtenir jusqu'à 97 p. 100 de germination avec des graines de *Cuscuta Epithymum*. Nous n'avons malheureusement pas eu la même réussite.

STANGANELLI, en 1947, avait émis l'hypothèse que le taux très bas de germination des graines d'*O. speciosa* dépendait des tannins contenus dans les téguments.

La présence d'agents inhibiteurs et notamment de polyphénols dans les organes reproducteurs d'un grand nombre de plantes fut, par la suite, pleinement confirmée par les recherches de WENT (1953), d'OPPENHEIMER (1959) et de VARGA (1959).

Dans la nature, ces substances empêchent la germination tant qu'elles n'ont pas été éliminées par une quantité suffisante de pluie.

Nous avons essayé d'éluer ces substances en opérant une percolation des graines au moyen d'eau ou de solvants organiques (alcool amylique, acétate d'éthyle, etc.), mais les résultats ont été toujours négatifs.

Un autre procédé employé pour augmenter le pourcentage germinatif des graines de *Cuscuta europæa* L., normalement très bas (2 à 5 p. 100), consiste en une macération de quinze minutes dans une solution à 3 p. 100 d'eau de Javel (FRITSCHÉ et BOUILLENNE, 1958).

En 1952, TONNIER est arrivé, simplement par un contact de quarante-huit heures avec de l'eau de Javel ordinaire, à obtenir la germination de graines de Vanille dès le dixième jour de leur ensemencement, alors qu'avec toutes les autres techniques employées auparavant on n'assiste aux premières germinations que un, deux ou même sept mois après.

La pénétration de l'oxygène à l'état natif à travers les téguments est souvent déterminante pour la germination de certaines graines. Nous avons fait agir à des concentrations différentes et à des temps de contact variables de l'eau de Javel, de l'hypochlorite de calcium ou de l'eau oxygénée, mais en vain.

Nous avons étudié plus particulièrement l'action des oxydants, non pour lever la dormance, mais pour stériliser les graines de tous les microorganismes qui les souillent et qui sont souvent dans les boîtes de Pétri un obstacle à leur développement. Cette stérilisation se révèle indispensable lorsqu'on emploie des milieux nutritifs gélosés répartis en tube.

Il est évident qu'il est difficile, comme l'a souligné IZARD (1953), de stériliser ces semences sans pouvoir exactement contrôler leur valeur germinative ; néanmoins, les conditions expérimentales suivantes nous ont permis de diminuer considérablement les souillures microbiennes ou cryptogamiques, sans toutefois empêcher ultérieurement la germination : les graines à désinfecter sont mises dans un petit tube de verre stérile (tube à hémolyse) contenant une solution à 70 g par litre d'hypochlorite de calcium à 110° filtrée avant l'emploi. Le contact des graines avec cette solution est maintenu pendant dix minutes. On décante, on procède à un lavage rapide à l'eau distillée stérile et, avec une anse de platine flambée, on agglutine ces graines pour les déposer sur le milieu choisi, comme pour un ensemencement microbien.

D'autres essais sans résultats ont été faits encore pour faciliter l'imbibition : immersion dans l'alcool, qui peut agir comme mouillant, dans des solutions d'ammonium quaternaires ou de saponines. Ces derniers corps agissent par leurs propriétés tensio-actives sur l'absorption d'eau et en même temps augmentent la vitesse de réaction des desmolases. Ils ont une action favorable sur la germination à condition de respecter les concentrations utiles et la durée du temps d'application (BALANSARD, 1951). Mais des doses de 1/10 000 à 1/100 000 et des temps de contact de douze à vingt-quatre heures se sont révélés inefficaces.

Ces différents essais nous montrent que l'inhibition des graines de l'Oro-

banche du Lierre ne paraît pas être le fait d'une dormance tégumentaire ; c'est du côté de l'embryon que nous avons, par la suite, porté nos efforts.

III. ESSAIS EFFECTUÉS POUR LEVER UNE DORMANCE EMBRYONNAIRE. — Nos premières tentatives ont eu pour but de rechercher s'il ne fallait pas à cet embryon des conditions très particulières de milieu pour se développer et notamment une zone de concentration en ions hydrogènes nettement délimitée.

Par la suite, nous avons expérimenté diverses substances douées d'une action trophique ou catalytique, pensant par là mettre en mouvement un cycle de réactions levant l'inhibition de la graine.

1^o *Études des conditions physiques.* — La plupart des auteurs ayant étudié la germination asymbiotiques des Orchidées insistent fortement sur la nécessité de ramener le pH des milieux de culture à une zone assez étroite, comprise entre des valeurs de 4,5 et 5,5 (HENRIKSON, 1951).

KRENNER (1958) indique, d'autre part, dans son étude sur la germination d'*O. cumana*, que la capacité germinative de ces graines est en relation avec le pH et que celles-ci sont capables de germer, sans stimulant extérieur, quand le pH du sol est inférieur à 6,5.

Nous avons essayé dans ce but l'action de toute une gamme de solutions tampons phosphatés ou citratés variant du pH 4 au pH 6,8.

Aucune germination n'ayant été observée, nous ne pensons pas qu'une acidité déterminée du milieu soit une condition suffisante pour permettre le développement des graines d'*O. Hederæ*. Néanmoins, un pH compris entre 5,5 et 6,4, qui d'ailleurs correspond à l'acidité des excréments radiculaires du Lierre, semble nécessaire.

2^o *Études des conditions biochimiques.* — Certaines substances nutritives, tels des sucres ou des acides aminés, pourraient-elles faire défaut aux graines d'Orobanche, plante parasite ? C'est ce que nous avons envisagé en premier lieu.

Nous avons utilisé comme sucres : le saccharose, le glucose, le fructose le maltose, le xylose, l'arabinose et comme acides aminés ceux que nous avons trouvés être les plus abondants dans les sécrétions radiculaires du Lierre : c'est-à-dire les acides aspartique et glutamique, l'alanine et la leucine ; mais aucune des concentrations essayées ne nous a donné de résultats.

Dès lors, un élément nutritif ne semblant pas nécessaire, la dernière hypothèse à formuler était qu'il pouvait manquer à la graine d'Orobanche un facteur indispensable doué d'une action catalytique (vitamines ou substances minérales), nécessaire aux réactions biochimiques déclenchant la germination.

IZARD, en 1953, avait obtenu pour la première fois la germination d'une Orobanche (*Phelypæa ramosa*) au moyen de substances susceptibles d'être élaborées par la racine hospitalière telles que des vitamines hydrosolubles

à noyau « pyridine » : nicotamide (vit. PP) et pyridoxine (vit. B₆) (1). Leur utilisation à diverses concentrations et sur des graines en parfait état germinatif ne nous a amené aucun résultat ; de même d'ailleurs qu'un certain nombre d'autres substances : thiamine, riboflavine, biotine, pentothénate de calcium, méso-inositol, acides folique et ascorbique, qui se révèlent être pourtant sur beaucoup de graines de puissants agents stimulant la germination (MARIAT, 1951 ; DEYSSON, 1952 ; HENRIKSSON, 1952).

Certaines substances minérales comme les nitrates (TOOLE, 1956) et les phosphates (NAPPZINN, 1958) sont susceptibles aussi de déclencher la germination de graines en dormance. Nous les avons expérimentées, ainsi que les solutions minérales de KNOP et de HELLER, sans qu'elles manifestent aucune action positive sur nos graines.

IZARD, en 1954, au cours de nouvelles recherches sur l'Orobanche du Tabac, réussissait à obtenir la germination de ces graines au moyen de sels de magnésium (sulfate et carbonate).

Ces composés furent sans effet sur nos graines, mais, alors que nous perdions tout espoir de voir se réaliser ces germinations au moyen de substances nettement définies, nous vîmes enfin germer les graines de l'Orobanche du Lierre en utilisant simplement la solution de biocatalyseurs minéraux de HELLER (2).

Avec des graines récoltées en juillet 1956 et mises en expérimentation le 25 novembre 1958, suivant la technique en goutte pendante de BROWN et à une température de 19° à 22°, nous avons, vingt et un jours après, un pourcentage, faible il est vrai, de 9 p. 100 de graines germées.

Nous avons essayé de faire agir individuellement chaque produit de cette solution afin de découvrir quel était l'élément ayant déterminé le développement de nos graines, mais aucun, pris en lui-même, n'a donné de résultats.

Il semble donc que ce soit seulement l'ensemble de ces ions qui agissent.

Peut-on essayer d'apporter une explication à ce phénomène ? Des hypothèses sont pour le moment seules permises.

Des ions minéraux pourraient catalyser un ensemble ou une même chaîne métabolique indispensable au développement de la graine, ou bien, au contraire, bloqueraient certains inhibiteurs. Cette dernière supposition nous est suscitée par des travaux japonais de TAMARI et KAJI (1953). Quelques substances comme l'acide α -pyridine carboxylique ou ses dérivés, existent dans de nombreuses plantes et se révèlent être des inhibiteurs de croissance antagonistes de la gibberelline.

Or, si l'adjonction de certains ions, comme le fer, diminue partiellement

(1) Ces résultats ont été à nouveau pleinement confirmés par DONINI en 1959 sur les graines de la même espèce.

(2) Composition de la solution de biocatalyseurs de HELLER utilisée :

Cl ₃ Fe, 6 H ₂ O	1 mg	AlCl ₃	0,03 mg
SO ₄ Zn, 7 H ₂ O	—	NiCl ₂ , 6 H ₂ O	—
BO ₃ H ₃	—	SO ₄ Cu, 5 H ₂ O	—
SO ₄ Mn, 4 H ₂ O	0,1	1 K	0,01 mg

Eau bidistillée Q. S. P. 1.000 ml.

leur activité inhibitrice, l'adjonction simultanée d'ions fer, cuivre et manganèse la supprime totalement en chélatant ces molécules, c'est-à-dire en les bloquant et les rendent ainsi inactives.

Mais une expérimentation plus poussée pourrait seule justifier cette hypothèse.

Ce lot de graines ayant germé sous l'influence de biocatalyseurs minéraux, avait été prélevé sur des Orobanches d'une taille exceptionnelle (75 cm), fixées sur des Lierres en bordure d'un jardin particulier. Ce lot, dont l'étude génétique ne put être faite, fut entièrement utilisé dans ces essais et il ne nous fut plus possible, par la suite, en nous mettant dans les mêmes conditions, mais avec d'autres lots de graines dont la faculté germinative avait été éprouvée par ailleurs, de renouveler ces expériences.

IZARD obtenait en 1958, par l'action de solutions de gibberelline, la germination de l'Orobanche du Tabac avec des pourcentages assez élevés.

Nous avons essayé cette substance, à des concentrations de 1 à 200 mg de produit par litre, sur des graines d'*O. Hederæ* récoltées en 1955, 1956, 1958 et 1959.

Ces graines ont germé, mais avec un taux assez faible et sans relation avec la période de récolte. Les concentrations de l'ordre de 50 à 100 mg/l de gibberelline se sont révélées les plus efficaces.

D. Conclusions. — De cette longue étude sur la germination des graines de l'Orobanche du Lierre, espèce qui n'avait jusqu'à présent fait l'objet d'aucune recherche, nous pouvons retenir les points suivants :

On ne peut encore à l'heure actuelle réaliser avec certitude et dans des conditions nettement définies la germination des graines des différentes espèces d'Orobanchacées.

D'une façon générale, chaque espèce ne germe qu'avec le stimulant, de nature encore inconnue, excrété dès la formation des poils radiculaire par la racine de la plante-hôte.

Le contact avec cette racine n'est, toutefois, nullement nécessaire.

Pour l'Orobanche du Lierre, la lumière et le taux d'humidité paraissent sans influence. Par contre, la température nécessite un optimum de 19 à 24°, au-delà duquel aucune germination ne peut avoir lieu.

Les études entreprises jusqu'à présent ne permettent pas encore de déterminer les causes réelles de l'impossibilité qu'ont les graines de la plupart des espèces de germer naturellement d'elles-mêmes, dans des conditions normales.

Il semblerait que l'on soit en présence d'une dormance plutôt embryonnaire que tégumentaire, d'origine d'ailleurs très variable.

Pour *P. ramosa*, par exemple, diverses substances telles que la pyridoxine, la nicotamide, les sels de magnésium et la gibberelline, suffisent pour déclencher la germination (IZARD, 1953-1954).

Chez *O. Hederæ*, nous avons obtenu de semblables résultats avec la gibberelline, mais aussi, et pour certains lots seulement, avec des biocatalyseurs minéraux.

Jusqu'à présent, ce sont d'ailleurs les deux seules espèces que l'on ait réussi à faire germer au moyen de substances chimiquement définies.

D'après des recherches très récentes, certaines espèces sont capables, comme des plantes autotrophes, de germer d'elles-mêmes, sans stimulation extérieure, simplement dans l'eau pure, avec toutefois des conditions quelque peu différentes : *P. ramosa*, IZARD, 1957 ; *O. cumana*, KRENNER, 1958 et *P. arenaria*, PRIVAT, 1959.

Ces résultats permettent de concevoir, parmi les Orobanchacées, l'existence de différents degrés de parasitisme, non seulement entre les espèces mais à l'intérieur des espèces elles-mêmes ; ces degrés, allant de l'exigence d'un stimulant particulier jusqu'à l'autonomie germinative des plantes chlorophylliennes, pourraient être, à l'origine, en relation étroite avec la biologie de l'hôte.

L'Orobanche du Lievre parasitant presque exclusivement un seul hôte, il ne nous a pas été possible d'étudier ce problème ; mais il serait intéressant, chez une espèce parasitant des plantes diverses, de comparer les conditions germinatives de leurs graines en fonction de chaque hôte particulier.

Beaucoup de recherches sont encore à entreprendre en ce sens.

3° Observations morphologiques sur la germination des graines d'Orobanche. — Sur l'ensemble des espèces dont nous avons pu suivre la germination et ses diverses étapes, nous n'avons remarqué entre elles aucune différence spécifique importante. Aussi ces observations sur les graines d'*O. Hederæ* s'étendent-elles aux graines d'*Orobanche minor*, *O. Epithymum*, *O. loricata*, *O. Rapum* et *Phelypæa arenaria*.

Une graine sur le point de germer ne se distingue des autres par aucun gonflement ni éclaircissement particulier ; à peine si les cellules du testa bordant la zone micropylaire s'écartent quelque peu sous la poussée des premières cellules en division de l'embryon (fig. 6 C).

Il n'y a pas rupture des téguments de la graine, ni décoloration particulière du testa, comme on l'observe dans la germination des Orchidées.

Les cellules de l'embryon prolifèrent et continuent leur croissance pour former un filament délicat et presque transparent.

Dans la planche 16 de sa « Monographie », VAUCHER représentait « une graine (d'Orobanche du Chanvre) commençant à germer, poussant des racines dans l'eau » (fig. 5).

Tout comme CASPARY et SOLMS-LAUBACH, on peut être étonné de voir, en effet, des ramifications sur un filament germinatif d'Orobanche.

Nous n'avons personnellement jamais observé, il est vrai, la germination de l'Orobanche du Chanvre (*Phelypæa ramosa* C. A. Mey). Il nous a été donné cependant d'étudier une espèce voisine, *Phelypæa arenaria* Walp.

Parmi le nombre considérable de germinations que nous avons obtenues de cette espèce, nous n'avons jamais aperçu de germe qui soit ainsi ramifié.

KOCH pensait d'ailleurs que ces « germes » n'étaient autres que « des filaments de Champignon établis sur les graines ».

Dans les recherches que nous avons entreprises nous-mêmes nous avons été souvent abusé par certaines formations au niveau du micropyle de la

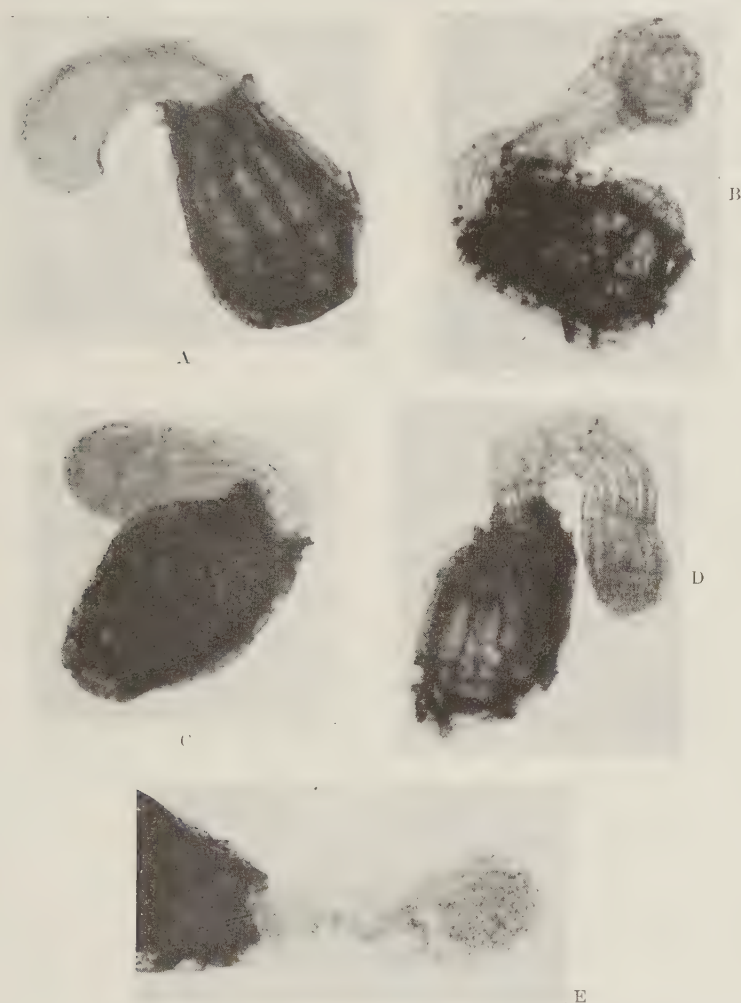


FIG. 6. — Graines de diverses espèces d'Orobanche en germination. ($\times 160$.)

A et E : *Orobanche Hederæ* Duby.

B : *O. Epithymum* DC.

C : *O. loricata* Reich.

D : *O. minor* Sutt.

Remarquer : le testa peu déchiré (sauf C), les cellules du filament germinatif orientées dans le sens de la longueur, la partie terminale du filament plus dense, renflée, remplie de matières nutritives (B, C, D, E), et d'amidon (E), avec certaines cellules en forme de papilles (A, B).

graine, ressemblant étonnamment aux expansions cellulaires de l'albumen qui ont été fort bien observées par FAVARGER (1954) chez certaines graines de *Saxifraga*. Dans notre cas, ces formations étaient bien réellement des proliférations cryptogamiques.

Ce filament peut, au cours de son développement, soit rester rectiligne (fig. 6 E), soit se recourber. Parfois même, il s'enroule presque autour de la graine sans que l'on observe de tropisme particulier dans le sens de cet enroulement, ou dans sa direction par rapport aux racines de la plante-hôte.

Sa taille est en moyenne de 1 à 2 mm et peut atteindre quelquefois, après deux à trois semaines, de 3 à 4 mm de long.

Les cellules de ce germe sont allongées dans le sens du grand axe (fig. 6 B, C, D et E) et deviennent de plus en plus petites à mesure que l'on s'approche de l'extrémité.

Cette extrémité se renfle en une masse plus ou moins tuberculeuse, dense, opaque, contrastant ainsi avec la transparence du filament lui-même (fig. 6 B, D et E). On assiste d'ailleurs, à mesure que ce tube croît, à une migration des substances nutritives et notamment de l'amidon depuis la partie du pro-embryon resté dans la graine jusqu'à l'extrémité du filament ou apex (fig. 6 E) (1).

Extérieurement, les cellules épidermiques de cet apex sont lisses, puis, peu à peu, se gonflent pour former des bourgeonnements en forme de lobes ou de papilles (fig. 6 A et B). Ces lobes vont, plus tard, dès le contact avec la racine-hôte, s'insinuer entre les cellules et se multiplier pour former le suçoir ou haustorium.

Intérieurement, ces cellules sont isodiamétriques à cytoplasme dense et à noyau volumineux. On ne distingue aucune différenciation entre elles et l'on peut considérer cette masse terminale homogène comme une zone méristématique dont les divisions ultérieures vont permettre la fixation et la pénétration du parasite dans la plante nourricière.

L'extrémité postérieure du germe reste étroitement engagée dans la graine. Le filament qui lui fait suite ne sert que d'intermédiaire entre les réserves nutritives de l'albumen et la partie bulbeuse de l'apex où se concentre toute la vitalité de la plante. Cet organe, qui vit essentiellement sur les réserves accumulées dans l'albumen, peut conserver sa vitalité plus d'un mois, mais, en l'absence de plante-hôte, devient vite brun, se dessèche et meurt.

Ce filament germinatif, entièrement parenchymateux, issu du développement du pro-embryon, est-il un axe hypocotylé, une radicule, ou l'ensemble même de la plantule embryonnaire ?

Par la seule observation de ce stade germinatif, on ne peut donner aucune indication sur la valeur de cet organe.

Sa nature morphologique ne pourra être précisée que par l'étude ultérieure de son développement dans les tissus de la racine-hôte.

(1) En montant des germes d'Orobanché entre lame et lamelle dans une solution de KOH à 5 p. 100, notre attention a été attirée, en dehors de l'éclaircissement normal de la préparation, par la couleur jaune vif que prend le filament. Nous n'avons pas, pour le moment, recherché l'origine de cette coloration. Il n'est pas impossible que l'on soit là en présence soit d'un polyphénol, soit d'une substance flavonique. Simultanément IZARD et MASQUELIER (1958) et HARBORNE (1958) ont extrait des graines de *Phelypaea ramosa* une flavone qui, d'ailleurs, se dissout dans les alcalis pour donner une solution jaune intense.

2^e Étude de la fixation de l'Orobanche du Lierre sur son hôte.

HISTORIQUE.

Les premières observations que nous possédons sur la fixation des Orobanches sont dues au botaniste suisse VAUCHER qui, en 1827, écrivait : « Lorsque entraînée par la pluie et les arrosements, la graine de l'Orobanche arrive au contact des racines du Chanvre, elle s'y arrête incontinent par son extrémité allongée et y enfonce ces mêmes racicules que nous avons déjà vues se développer dans l'eau » (*loc. cit.*, p. 9).

En 1854, CASPARY formule sur les jeunes Orobanches de très intéressantes remarques, sans toutefois détailler le mode de pénétration du parasite dans la racine-hôte : « L'extrémité radiculaire (du germe d'Orobanche) désorganise alors par sa pression et perce le parenchyme cortical de la racine nourricière et s'implante dans le faisceau vasculaire » (*loc. cit.*, *Bull. Soc. Bot.*, p. 335).

SOLMS-LAUBACH, en 1867, signale que l'épiderme, le parenchyme, l'écorce et le xylème de l'hôte et du parasite s'interpénètrent l'un l'autre si étroitement qu'il est difficile de distinguer la limite entre leurs tissus.

Le travail le plus considérable sur cette question est publié en 1887 par KOCH, qui résume ses nombreux travaux antérieurs dans une sorte de monographie des Orobanches.

Cet auteur n'a observé le premier suçoir que lorsque celui-ci était enfoncé dans le système libéro-ligneux de l'hôte. « Certaines cellules du parasite, croissant plus vite, pénètrent intercellulairement entre les éléments de la nourrice qui sont entourés, comprimés, puis résorbés. Les cellules voisines suivent les premières. Pendant que des lobes se forment ainsi dans toutes les directions, la nourrice excitée produirait vers le parasite des prolongements ligneux qui viendraient s'aboucher avec des branches du suçoir » (cité par HOVELACQUE, p. 560).

La même année, HOVELACQUE, dans une thèse très importante sur l'appareil végétatif des Bignoniacées, Rhinanthacées, Orobanchacées et Utriculariées, complète les observations de KOCH.

N'ayant pas vu, lui non plus, la première partie du développement de l'Orobanche, il suit cependant avec beaucoup de soin la pénétration des suçoirs secondaires que forment les racines de certaines Orobanches (*O. cruenta*) en s'introduisant dans les tissus de l'hôte.

« Les cellules pilifères de l'Orobanche pénètrent entre les cellules dissociées de la racine nourrice, non en les perforant, mais en cheminant dans l'épaisseur même de leur paroi, puis se divisent à mesure qu'elles s'allongent. Toutes les cellules de la nourrice qui sont touchées par le parasite ou qui sont immédiatement sous-jacentes, s'hypertrophient, puis leurs parois cellulaires se dédoublent et les éléments se dissocient. Autour de ces suçoirs très simples, on ne voit nulle part de cellules écrasées ou perforées » (*loc. cit.*, p. 598-599).

Les cellules du suçoir qui sont les premières en contact avec les vaisseaux ligaeux de la nourrice, épaississent leurs parois et se lignifient, mais « nous ne croyons pas que le parasite et la plante nourricière cherchent à se mettre en rapport par leurs tissus homologues » (*loc. cit.*, p. 634). « Les suçoirs des Rhynanthacées (*Melampyrum*, *Rhinanthus*, *Euphrasia*, *Bartsia*, *Odontites*, *Pedicularis*, *Tozzia*) et des Lathrées (*Lathræa clandestina* et *L. squamaria*) ont la même structure générale que les gros suçoirs de l'Orobanche. Ils pénètrent de la même façon dans les plantes nourrices, sans écrasement ni perforation des tissus, mais par dissociation des éléments, et cela, quel que soit le volume du coin pénétrant » (*loc. cit.*, p. 612).

Toujours la même année, en 1887, LECLERC DU SABLON fait paraître une étude sur les organes d'absorption des plantes parasites, et ses observations s'opposent d'une façon assez nette à celles formulées par HOVELACQUE sur les mêmes familles (Rhinanthacées).

« Les cellules terminales du suçoir s'enfoncent dans la plante nourricière comme un mycélium de Champignon dans les tissus de son hôte, en dissolvant les parois qu'elles rencontrent. La diastase, inconnue d'ailleurs, au moyen de laquelle ces cellules se frayent un passage paraît impuissante contre les parois épaisses et lignifiées du bois » (*loc. cit.*, p. 95). « On dirait que la diastase au moyen de laquelle l'écorce et le liber ont été dissous éprouve quelques difficultés à attaquer le bois. Dans plusieurs cas cependant, il paraît démontré qu'une certaine quantité de bois a été dissoute » (*loc. cit.*, p. 107).

GRANEL publie en 1887, année qui s'est montrée très fertile en travaux sur les plantes parasites, une note sur l'origine des suçoirs de ces plantes, mais se préoccupe surtout de la nature morphologique des suçoirs secondaires de l'Orobanche.

A partir de 1887, et à la suite des travaux de LECLERC DU SABLON, la plupart des auteurs vont dorénavant considérer la pénétration des tissus du parasite dans la racine-hôte comme le résultat d'un processus presque essentiellement digestif.

Une phrase de CHATIN (1891) est caractéristique à ce point de vue : « Le suçoir pénètre dans les bois les plus durs par action spéciale en ramollissant et dissolvant au point de contact les tissus qui font échec à sa marche » (*loc. cit.*, p. 599).

Cette notion de dissolution des cellules par digestion se retrouve à nouveau dans les travaux de MIRANDE, en 1901, sur les Cuscutées.

« Le suçoir fait son chemin dans les tissus nourriciers par la double action de l'effet mécanique et de l'effet chimique... Les cellules papilleuses sécrètent un ferment qui agit par action dissolvante sur la cellulose et traversent les tissus en les trouant sur leur passage sans laisser de résidu. C'est évidemment par digestion que s'accomplit ce cheminement et au moyen de ferments appropriés » (*loc. cit.*, p. 41). « Aux environs du point blessé, l'assise génératrice subéro-phellodermique de l'hôte prend une activité plus grande. Il se produit peu de liège, mais de nombreuses couches de phelloderme. Ces proliférations en augmentant l'épaisseur de

l'écorce servent, en quelque sorte, de moyen de défense à l'hôte en augmentant le chemin à parcourir par le parasite » (*loc. cit.*, p. 41-45).

En 1901, FRAYSSE énonce pareillement dans sa *Contribution à la biologie des plantes Phanérogames parasites* : « C'est grâce à l'activité incessante de certaines diastases que le parasite (*Cytinus*) peut cheminer, en les digérant, à travers les tissus hospitaliers. L'action de la cellulase se manifeste visiblement sur l'appareil ligneux de l'hôte. Les coupes faites dans toutes les régions envahies permettent de voir un anneau de bois partiellement digéré, non coloré par le vert d'iode, alors que le bois non attaqué se présente avec des caractères normaux » (*loc. cit.*, p. 165).

Dans leur *Cours de Botanique* paru en 1901, BONNIER et LECLERC DU SABLON ne signalent ni mode de pénétration, ni fixation de l'Orobanche ; la seule indication qu'ils donnent à ce sujet nous paraît reprendre l'erreur initiale de VAUCHER qui avait observé des « racicules » sur le filament germinatif d'une Orobanche : « Les premières racines qui se forment peu après la germination disparaissent bientôt et, lorsque l'Orobanche est au contact d'une racine nourricière, il se forme un renflement d'où part la tige d'Orobanche » (*loc. cit.*, p. 410).

Les observations biologiques et anatomiques de CHEMIN en 1920 sur le genre *Lathræa* ne sont pas différentes de celles des auteurs précédents.

L'implantation est le résultat d'une action digestive plus que d'une action mécanique. Les membranes cellulosesques, subérifiées ou lignifiées ont été plus ou moins rapidement transformées, amolies, digérées. La digestion est plus rapide pour les tissus cellulosesques ; elle est plus lente pour les tissus lignifiés.

En 1925, TATE publie ses travaux sur l'anatomie de l'Orobanche du Lierre et sa fixation sur l'hôte.

N'ayant jamais observé de germination, cet auteur n'a pu suivre les premières phases de pénétration du parasite dans les tissus de l'hôte.

TATE remarque qu'une part importante dans le développement des tissus de connexion entre hôte et parasite est prise par le Lierre, dont certaines cellules épaississent leur membrane, se lignifient et viennent en contact étroit avec les trachéides de l'Orobanche.

Il note aussi que la pénétration du parasite semble stimuler le cambium de la partie de la racine de l'hôte immédiatement en contact avec lui.

Puis, pendant près de vingt-cinq ans, l'attention semble se porter presque exclusivement sur l'étude de la germination des Orobanches (CHABROLIN, BLANCHARD, BROWN, etc.).

On pouvait donc croire que les problèmes d'ordre anatomique et cytologique posés par ces plantes parasites étaient résolus.

Cependant, en 1953, BORZI étudie aux rayons X les relations anatomiques d'une Orobanche (*O. crenata*) avec son hôte et conclut ainsi que la jonction du parasite avec les racines de *Faba* serait très superficielle.

En 1956 (*b.*), KADRY et TEWFIC publient l'ensemble de leurs observations sur l'Orobanche de la Fève depuis la germination jusqu'à la floraison.

Voici la description des processus de pénétration du parasite (*O. crenata*)

dans son hôte (*Vicia Faba*) vus par ces auteurs : « L'extrémité du tube germinatif vient en contact direct avec la racine-hôte où la couche pilifère de cette région apparaît brun pâle. Les cellules externes de cette dernière couche deviennent hautement lignifiées, agissant ainsi comme un mécanisme de défense contre l'attaque du parasite. Les cellules apicales de l'organe germinatif forcent leur chemin dans les tissus de la racine-hôte. Au point de leur attachement, la lignine disparaît. Ceci est dû à l'action dissolutive d'une substance sécrétée par le parasite. Une des cellules du parasite commence l'assaut en émettant une expansion en forme de papille. Elle force son chemin à travers la membrane de la cellule de l'hôte qui lui est opposée, creusant un petit pore pour passer à travers sous forme amiboïde. Ses contenus progressent à travers la cellule voisine de l'hôte de la même manière » (*loc. cit.*, p. 388). « Par des divisions successives et de rapides multiplications, le petit haustorium se développe et produit le gonflement de la région infestée de la racine de l'hôte » (*loc. cit.*, p. 389).

Les relations entre les tissus de l'hôte et du parasite ne semblaient pas encore définies, puisque deux ans après, en 1958, KRENNER fait paraître dans les *Acta Botanica* de l'Académie des Sciences de Hongrie les résultats d'une longue étude sur l'Orobanche du Tournesol (*O. cumana* Wallr.) et donne sur cette fixation l'interprétation suivante : « En atteignant la surface de jeunes racines de Tournesol, l'apex du filament germinatif de l'Orobanche devient sphérique et émet une sécrétion glutineuse au moyen de laquelle il adhère à l'épiderme de la racine. Et c'est en dissolvant la pectine des membranes cellulaires de la racine-hôte que le parasite débute son mécanisme de pénétration » (*loc. cit.*, p. 132).

« Les excroissances de l'haustorium dissolvent, gélatinisent, incorporent les membranes attenantes des cellules-hôtes..., passent à travers la gaine de l'endoderme et du péricycle... et arrivent au paquet vasculaire » (*loc. cit.*, p. 136). « Jusqu'à présent, l'haustorium a été capable de dissoudre et de digérer presque facilement les cellules de la racine-hôte, il est arrivé à un obstacle qu'il ne peut vaincre avec la même facilité, c'est-à-dire les parois épaissies, spiralées et réticulées des trachéides... Et, puisque la sécrétion de l'haustorium est incapable de dissoudre chimiquement la lignine et de digérer les trachéides, l'haustorium va employer maintenant un autre moyen. Il dissout la lamelle primaire pectique qui lie les cellules trachéides ensemble et ainsi ces dernières se trouvent dissociées... Mais les trachéides ne restent pas longtemps dans cet état, car maintenant rentre en action l'appareil suceur (*suctorial apparatus*) du germe de l'Orobanche, par lequel les trachéides quittent leur place et commencent à monter, c'est-à-dire à être aspirées (*to be snuffed upwards*) l'une après l'autre dans l'intérieur gélatineux de l'haustorium. Ce mécanisme d'aspiration (*mechanical snuffing*) est manifeste... par le phénomène tournoyant des trachéides qui sont tirées par l'haustorium. La question qui se pose : comment le germe d'Orobanche acquiert-il un aussi considérable pouvoir de succion, capable de mouvoir (*to move*) les trachéides ? La réponse est : le pouvoir de succion trouve son origine de l'intérieur de la graine d'Oro-

banche et est produit par le vide (*vacuum*) qui provient de l'aspiration graduelle de l'air étroitement accumulé dans l'endosperme » (*loc. cit.*, p. 141).

Ces deux dernières publications, parues au cours de notre travail, apportaient donc une interprétation toute nouvelle du problème posé par la pénétration et les relations des tissus d'une plante parasite avec son hôte. Mais, les quelques observations que nous avons faites dans la zone de contact hôte-parasite ne nous semblant pas relever des mêmes processus décrits par KADRY pour *O. crenata* et par KRENNER pour *O. cumana*, nous avons repris en détail cette étude sur notre propre matériel, l'Orobanche du Lierre.

RECHERCHES PERSONNELLES. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES SUIVIES.

Pour les organes relativement épais, nous avons réalisé des coupes « à main levée », colorées à la phloroglucine ammoniacale et au carmin-vert de Mirande.

Mais, pour la plupart de nos recherches, nous avons utilisé la technique classique d'inclusion à la paraffine après fixation.

Le fixateur de Regaud au formol-bichromate fut employé tout d'abord, afin de suivre les transformations cytoplasmiques qui pourraient se produire dans la zone de contact hôte-parasite, mais la très grande quantité de substances polyphénoliques contenue dans les tissus, formant avec le fixateur un précipité abondant (*cf.* fig. 7), nous l'a fait abandonner.

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le picroformol alcoolique de Bouin-Dubosq-Brasil par contact de douze à quarante-huit heures, selon le volume de l'organe à fixer. Celui-ci, après lavage et déshydratation, est inclus dans la paraffine, coupé au microtome à une épaisseur de 7 à 10 μ , étalé, déparaffiné et coloré. Le colorant que nous avons employé de préférence à l'hématoxyline ferrique, est la safranine-vert lumière.

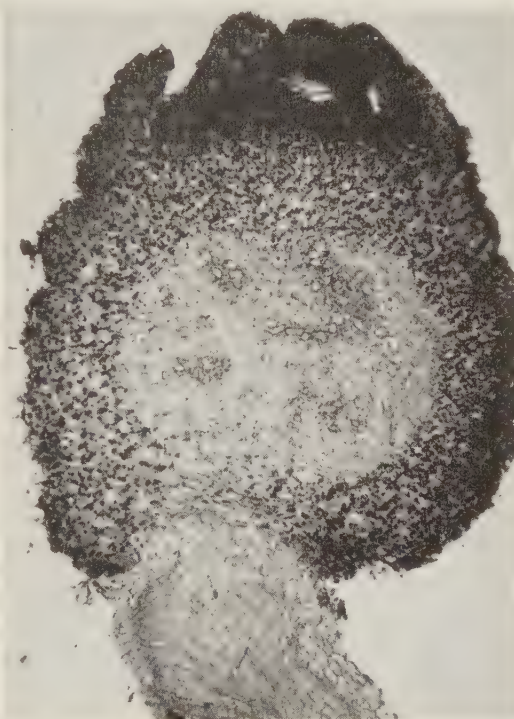


FIG. 7. — Coupe longitudinale d'un tubercule d'*Orobanche Hederæ* fixé par le fixateur de De Regaud. Remarquer l'abondant précipité de substances polyphénoliques à la périphérie du parasite.

Les coupes, collées à l'eau albumineuse, sont alors mises pendant six à vingt-quatre heures au contact d'une solution de safranine anilinée (mélange à parties égales de solution alcoolique de safranine saturée et d'eau anilinée saturée), puis différenciées dans l'alcool à 50° et enfin, colorées pendant trois à cinq secondes dans une solution alcoolique de vert lumière additionnée d'essence de girofle. La ligaine et les noyaux prennent une teinte rouge vif et la cellulose une teinte vert clair.

1° Étude morphologique de la fixation de l'Orobanche. — Parmi le nombre très considérable de germinations obtenues *in vitro*, nous n'avons qu'une seule fois observé la fixation d'un filament germinatif d'Orobanche sur la racine de son hôte.

Dans ce cas unique, les graines d'*Orobanche Hederæ* avaient été mises à proximité des jeunes plantules de Lierre le 23 mars 1959. Le 3 avril, nous obtenions les premières germinations et ce n'est que le 2 juin, soit deux mois après, que nous avons nettement observé les cellules de la partie terminale d'un germe déjà engagées dans les tissus du Lierre, au point de ne pouvoir détacher le filament sans risquer de le rompre. Le 5 septembre, soit trois mois après que la fixation ait été observée, l'extrémité du filament avait proliféré en une sorte de tubercule de près de 2 mm de diamètre et déterminé un accroissement presque identique de la racine nourricière dans la zone de contact.

Ce tubercule, aux cellules épidermiques brunes et déjà en partie exfoliées, conservait encore à son sommet le reste du filament germinatif, desséché et toujours engagé en partie dans le testa (fig. 8 B).

Cette fixation s'était produite très près du collet de la racine et sur une radicelle (fig. 8 A).

Sans vouloir, à partir de ce seul cas, généraliser nos observations, nous pensons néanmoins que la fixation d'une Orobanche, sur le Lierre tout au moins, ne semble possible que sur de très fines radicelles n'ayant pas plus de 0,5 à 1 mm de diamètre et dans une zone où l'assise pilifère est en partie dégénérée.

Nous avons obtenu un nombre très important de germes d'Orobanche en contact direct avec les poils de la racine principale du Lierre, mais jamais nous n'avons vu d'autre fixation se produire (1).

D'autre part, dans le sol, les jeunes Orobanches sont toujours fixées sur de très fines radicelles (fig. 9).

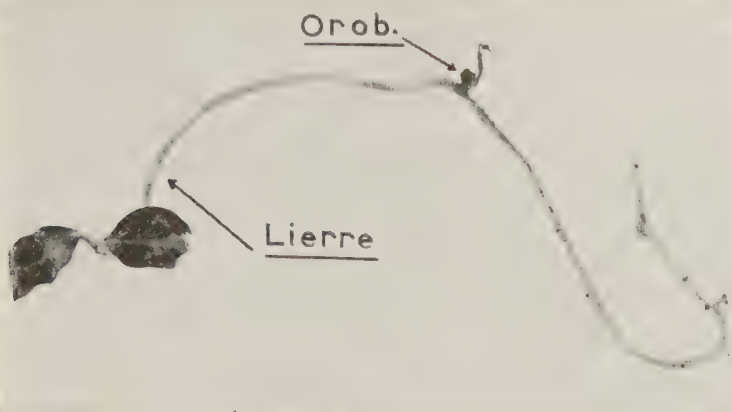
(1) La rareté des cas enregistrés pourrait provenir de nos propres conditions expérimentales.

En effet, nous savons actuellement, d'après les remarquables travaux de BOULLARD (1953-1954) à ce sujet, que le champignon endophyte qui infecte normalement les racines du Lierre, détermine une importante ramification de l'appareil radical et, au contraire, réduit le nombre des poils absorbants dans les parties envahies.

Or nous opérons en milieu aseptique et effectivement nos plantules produisent très rarement des radicelles.

Il serait très intéressant de comparer *in vitro* la capacité de fixation de l'Orobanche sur des plantules infectées ou non.

A priori, il n'est pas impossible que le Rhizomycète du Lierre (constamment présent dans la nature) ait une influence sur la fixation du parasite.



A

FIG. 8. — Fixation obtenue *in vitro* d'une graine d'Orobanche sur une radicelle de Lierre.

Remarquer la partie médiane du filament germinatif desséchée, l'épiderme du parasite déjà subérisé et le renflement de la racine de Lierre au point d'innoculation.

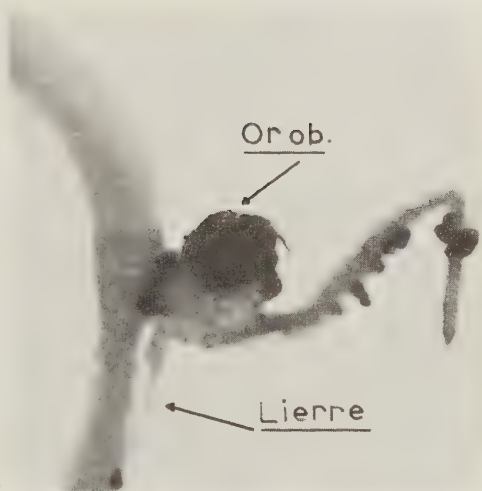
Germination de la graine d'Orobanche : 3 avril 1959.

Début de la fixation sur le Lierre : 2 juin 1959.

Observations effectuées le 5 septembre 1959.

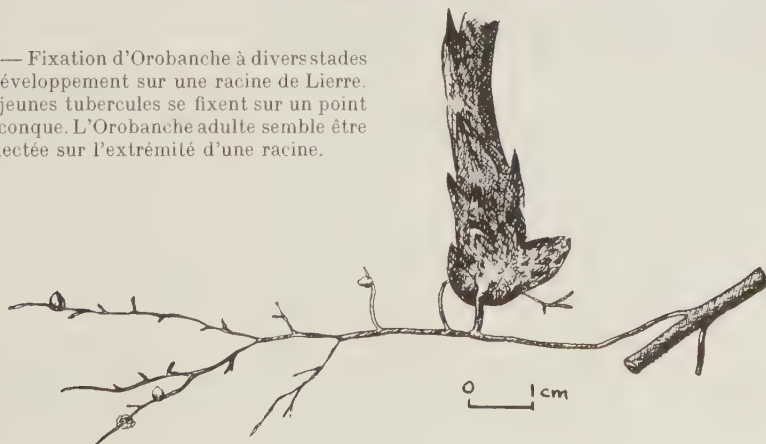
A. Plantule de Lierre avec l'Orobanche fixée près du collet sur une radicelle. (Grandeur nature.)

B. Détail de la fixation.



B

FIG. 9. — Fixation d'Orobanche à divers stades de développement sur une racine de Lierre. Les jeunes tubercules se fixent sur un point quelconque. L'Orobanche adulte semble être connectée sur l'extrémité d'une racine.



Des observations à peu près semblables ont été faites par KADRY et TEWFIC pour l'Orobanche de la Fève : « Les racines latérales de l'hôte (*Vicia Faba*) sont hautement infectées par le parasite, alors que la racine principale l'est très rarement » (*loc. cit.*, 1956 a, p. 281), et par TATE : « En répandant des graines sur des racines de Lierre poussant dans des pots, de petits tubercules d'Orobanche furent trouvés après deux mois environ attachés aux racines latérales du Lierre » (*loc. cit.*, 1925, p. 286).

Nous pouvons faire une autre remarque fort importante sur la croissance de l'Orobanche dans ses premiers stades de végétation. Cette croissance est extrêmement lente puisque, en quatre vingt-dix jours environ, le méristème initial a proliféré de 2 mm à peine, alors que, hors du sol, la hampe florale de l'Orobanche atteint, dans un temps trois fois moindre, une hauteur de près de 45 cm.

La multiplication cellulaire de l'Orobanche du Lierre est donc, dans les premiers stades végétatifs, très faible.

Nous n'avons pas réalisé l'étude cytologique de ce tubercule observé *in vitro*, car nous désirions suivre le développement ultérieur de cette Orobanche fixée ainsi près de tissus chlorophylliens et, d'autre part, ces cultures étant presque aseptiques, nous pensions pouvoir étudier ainsi d'une façon exceptionnelle la nutrition du parasite en le transplantant dans un milieu nutritif de composition déterminée.

Malheureusement, au cours du repiquage, la plantule a péri. Néanmoins, nous avons soigneusement suivi les diverses phases de la fixation du parasite dans les tissus de l'hôte en étudiant un nombre considérable d'Orobanches à tous les stades de leur développement.

Comme nous l'avons déjà précisé, le germe d'Orobanche se fixe en un point quelconque d'une petite racine latérale du Lierre et, en s'étendant à l'intérieur des tissus de l'hôte, détermine un renflement important de la racine nourricière dans la zone de contact (fig. 8 et 9).

GENTY (1952), dans une note au Bulletin de la Société Botanique, attirait l'attention sur « une particularité intéressante du parasitisme d'*Orobanche Malinskyana* Rouy : l'Orobanche a son suçoir fixé à l'extrémité même de la radicelle de la plante parasitée et non en un point quelconque de ladite radicelle, comme c'est le cas pour beaucoup d'Orobanches » (*loc. cit.*, p. 202).

Les observations que nous avons faites sur *Orobanche Hederæ* nous amènent plutôt à penser qu'au fur et à mesure que le parasite s'accroît l'extrémité de la racine hôte au delà du point de contact finit par se nécroser et par disparaître. La vascularisation du Lierre est alors presque complètement connectée à celle de l'Orobanche. C'est probablement la raison pour laquelle la plupart des Orobanches, une fois atteint un certain degré de développement, semblent fixées sur l'extrémité d'une racine-hôte.

Lorsque la racine sur laquelle se trouve l'Orobanche paraît se continuer de part et d'autre du point de contact, ou bien le parasite s'est fixé sur une radicelle au niveau exact de son point de sortie de la racine (fig. 8),

ou bien la continuation apparente de la racine n'est qu'une ramification latérale, prenant naissance au point d'union.

2^e Étude anatomique et cytologique de la fixation. — A. Progression des cellules du parasite

dans l'hôte — Tout comme les auteurs précédents, il ne nous a pas été possible, jusqu'à présent, de suivre le moment précis de la pénétration du parasite dans les cellules épidermiques de l'hôte; néanmoins, nous pouvons, d'après l'étude d'un très grand nombre de coupes effectuées dans des tubercules d'Orobanche peu développés, faire les remarques suivantes :

Les cellules de l'Orobanche directement au contact du *Lierre* se distinguent tout d'abord de celles de l'hôte par leur caractère de cellules en pleine activité : noyaux volumineux à un ou deux nucléoles et cytoplasme très dense (fig. 10 et 11). Ces cellules, par divisions successives et lentes, forcent leur passage entre les cellules du *Lierre* sans les lyser visiblement. On ne voit, en aucun moment, de perforation ni

de passage de la cellule parasite sous forme amiboïde dans les tissus de l'hôte, comme KADRY et TEWFIC (1956) l'ont signalé pour *O. crenata*.

Les cellules du *Lierre*, au contact du parasite, conservent leur noyau et leur cytoplasme de cellules parenchymateuses normales, sans qu'on puisse déceler, en quoi que ce soit, de destruction ou de digestion (fig. 10 et 11).

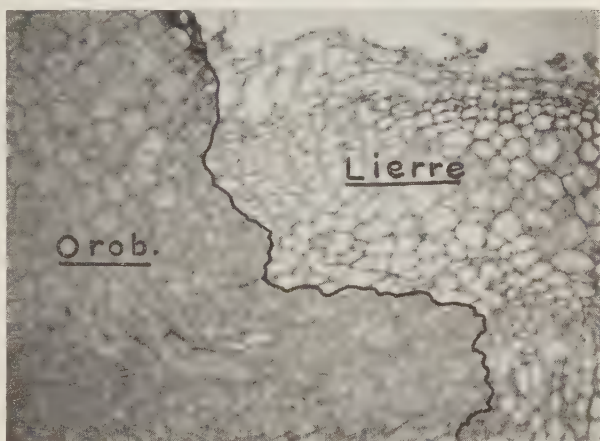


FIG. 10 et 11. — Coupes (transversales par rapport au *Lierre*) effectuées dans la zone de contact hôte-parasite.

On distingue nettement les cellules de l'Orobanche à cytoplasme dense et à noyaux volumineux qui progressent entre celles du *Lierre* et la division des cellules corticales du *Lierre*. On ne remarque aucune perforation de membrane, aucune zone de nécrose ni de subérisation. (Fix. D. B. ; S. V. L.) G. $\times 120$.)

Cette progression est tellement lente (2 mm en quatre-vingt-dix jours) que l'écartement cellulaire est rarement apparent.

De nombreux chercheurs ont fait mention d'une attaque enzymatique des matières pectiques de la lamelle moyenne de l'hôte par le parasite, lequel, grâce à cette dissolution, assurerait sa progression.

Il n'est pas impossible qu'il y ait effectivement lyse diastasique de la lamelle moyenne des cellules du Lierre par l'Orobanche; néanmoins, il est difficile de l'affirmer avec certitude.

B. Réaction de l'hôte à la pénétration du parasite. — On conçoit généralement le parasitisme comme une opposition entre deux organismes :

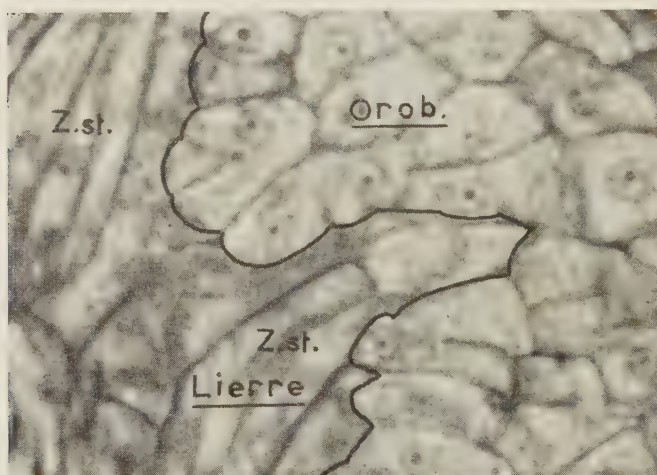


FIG. 12. — Détail de la pénétration des cellules de l'Orobanche dans le Lierre (coupes transversales par rapport à la racine hôte).

Les cellules du parasite, à cytoplasme dense et à noyau volumineux, progressent par division successives entre les cellules de l'hôte. On observe aucune lyse, ni réaction de défense. Dans la zone de contact, au niveau du rayon médullaire, les cellules du Lierre ont été stimulées (*Z. st.*), se sont allongées, facilitant ainsi la pénétration du parasite. (Fix. D. B. ; S. V. L. G. $\times 480$.)

le parasite, dont les actions sont offensives, spoliatrices, destructives ou toxiques, et l'hôte, dont les actions sont défensives.

Que voyons-nous dans la zone de contact hôte-parasite chez l'Orobanche du Lierre ?

Il y a évidemment action offensive de la part de l'Orobanche, en ce sens que les cellules de pointe de son suçoir ou haustorium, par multiplications successives, se frayent un passage dans les tissus de l'hôte.

Mais aucune action spoliatrice ou destructive ne se manifeste. Il y a vraisemblablement résorption des cellules de l'hôte, car l'on constate la disparition de ces cellules, sans que l'on puisse, pour le moment, en indiquer la cause.

Le Lierre ne se « défend pas activement » ; on ne remarque aucune zone de nécrose gommeuse, qui pourrait ainsi isoler le foyer local d'infection,

ni aucune formation, autour du point d'innoculation, de barrière formée de cellules subérifiées, comme c'est le cas dans certaines infections cryptogamiques (NOBÉCOURT, 1946). L'hôte ne réagit pas non plus à l'invasion en formant du liège dans le cortex, ou des tyloses dans les vaisseaux, ainsi que l'indique CHEMIN dans *Lathraea* (1920). On ne voit nullement, comme le signale MANGENOT à propos du parasitisme d'une Balanophoracée « autour du massif des cellules étrangères, les cellules du parasite qui réagissent en sécrétant, parfois en quantité considérable, une substance colorable par le vert d'iode et paraissant voisine de la subérine » (*loc. cit.*, p. 63).

Au contraire, on observe chez le Lierre, au niveau de la zone de pénétration de l'Orobanche :

1^o Une division des cellules corticales, ce qui détermine l'hypertrophie de la racine autour du point de fixation du parasite (fig. 10 et 11).

2^o Une absence de développement de l'assise génératrice libéro-ligneuse sur une zone plus ou moins large (zone stimulée = Z. st. sur nos figures), en relation vraisemblablement avec la structure de la jeune racine au moment de l'infestation. Il ne se forme donc ni bois, ni liber ; un vaste rayon ligneux apparaît dont l'ouverture est orientée vers l'Orobanche.

3^o Dans ce rayon ainsi formé, les cellules s'allongent en direction des cellules du parasite (fig. 12 et 13).

Quand on étudie de nombreuses coupes (transversales par rapport à l'hôte) de jeunes tubercules d'Orobanche, on a presque toujours l'impression que le parasite « s'efforce » avant tout d'atteindre dans sa progression le cœur du bois du Lierre (fig. 14 et 15).

En effet, la masse cellulaire en pénétration forme très souvent un cône exactement dirigé vers la moelle de l'hôte. On retrouve d'ailleurs dans beaucoup d'études faites sur la fixation des plantes parasites cette même idée selon laquelle le parasite « recherche à atteindre le bois pour en retirer l'eau et les sels dissous qui sont nécessaires à sa nutrition ».

Nous ne pensons pas qu'il y ait de la part de l'Orobanche du Lierre de « calcul prémédité ». Sa progression se fait tout naturellement suivant le sens d'un rayon ligneux, car les cellules de ce rayon ont été hypertrophiées et se sont orientées exactement vers le point d'implantation du parasite, facilitant ainsi, entre leurs membranes,

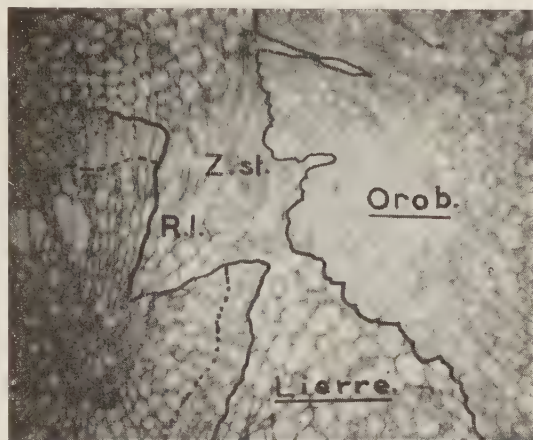


FIG. 13. — Coupe effectuée transversalement par rapport au Lierre dans la zone de contact hôte-parasite.

On remarque nettement l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules de l'hôte dans la zone stimulée (Z. st.) par le parasite, au niveau d'un rayon ligneux (R. l.) dont les cellules se sont différenciées. (G. $\times$ 120.)

la marche des cellules en multiplication active de l'Orobanche.

D'où proviennent ces transformations qui s'opèrent dans les tissus du Lierre au contact des cellules en multiplication de l'Orobanche ?

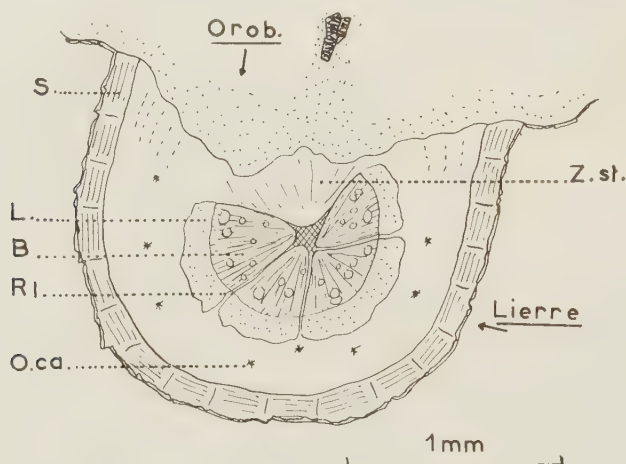


FIG. 14. — L'Orobanche paraît « chercher le bois de l'hôte » alors que ses cellules progressent naturellement dans le sens d'un rayon ligneux (*R. l.*) dans la zone stimulée (*Z. st.*) par le parasite. Certaines cellules se sont lignifiées dans le cœur du tubercule du parasite.

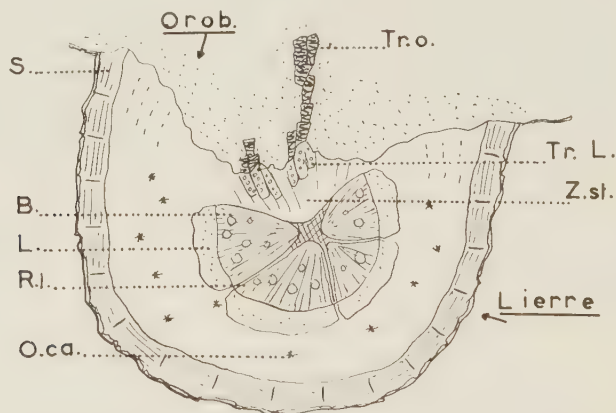


FIG. 15. — Au contact de l'Orobanche, certaines cellules du Lierre se sont différenciées en trachéides (*Tr. L.*). Puis bout à bout, les cellules parasites se sont incrustées de lignine (*Tr. o.*). La soudure des deux xylèmes est ainsi effectuée. Coupes effectuées dans la zone de contact hôte-parasite, transversalement par rapport au Lierre. *S*: suber ; *L*: liber ; *B*: bois ; *O. ca*: oxalate de calcium.

Est-ce simplement à la suite d'une suralimentation locale sous l'effet d'un appel excessif d'éléments nutritifs effectués par le parasite, mais dont l'effet peut, en partie, bénéficier à l'hôte ?

Ou bien, sous l'effet du parasite et grâce à certaines substances stimulantes exécrées par celui-ci, la matière vivante de l'hôte tendrait-elle à

reprendre des formes et une activité embryonnaire ? (CHEVAUGEON, 1957, *Mode d'action des champignons parasites*, p. 82 et 85.)

Nous penchons fortement pour la deuxième hypothèse et nous pensons, avec CAMUS (1949), que, lors de la croissance de méristèmes (les cellules de l'extrémité de l'haustorium de l'Orobanche sont d'ailleurs méristématiques), ces derniers « libèrent dans les tissus sous-jacents l'auxine, ou peut-être même l'acide indol-acétique, responsable des phénomènes d'histogenèse » (*loc. cit.*, p. 183).

Cette activité cellulaire

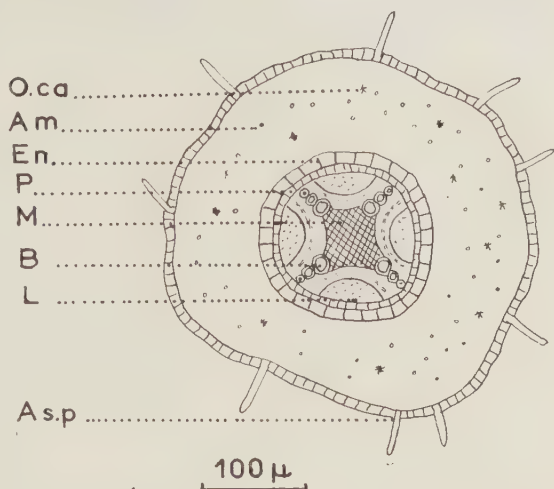


FIG. 16. — Coupe dans une racine de Lieke avant que l'Orobancha n'y soit fixée. (Structure primaire avec début de formation du cambium.)

En: endoderme; P: péricycle; As. p.: assise pilifère; M: moelle.

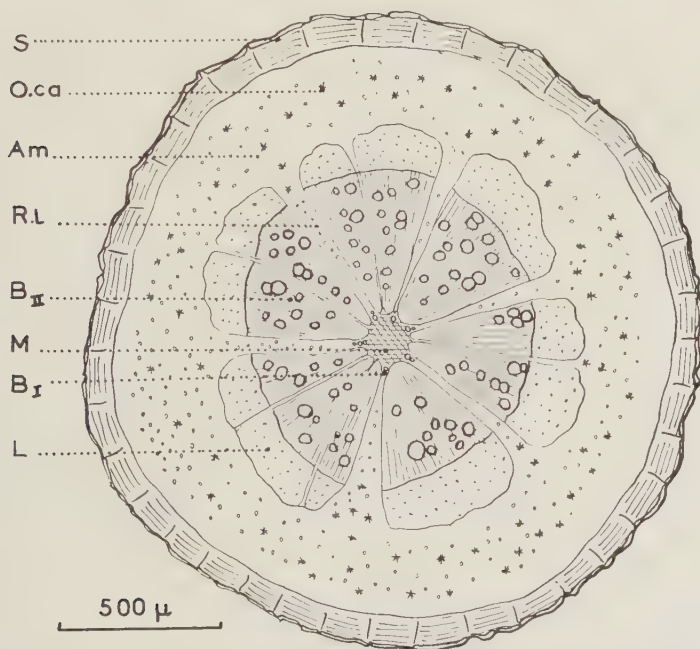


FIG. 17. — Coupe dans une racine de Lieke non parasitée. (Structure secondaire normale avec rayons ligneux (R. L.) formés par 1 à 2 assises de cellules.)

de l'hôte dans la zone de contact de l'Orobanche n'est donc pas, comme l'observait MIRANDE chez les Cuscutes, un moyen de défense pour augmenter le chemin à parcourir par le parasite, mais simplement une réaction

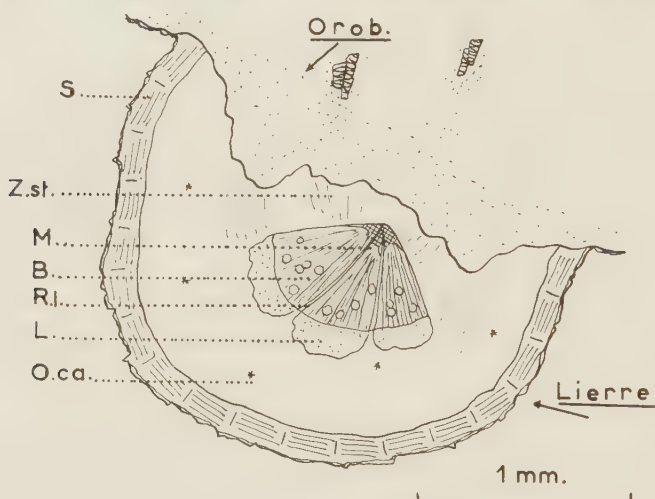


FIG. 18. — La fixation du parasite sur la racine du Lierre s'est effectuée à un stade plus jeune. Une partie importante de l'assise génératrice libéro-ligneuse s'est indifférenciée.

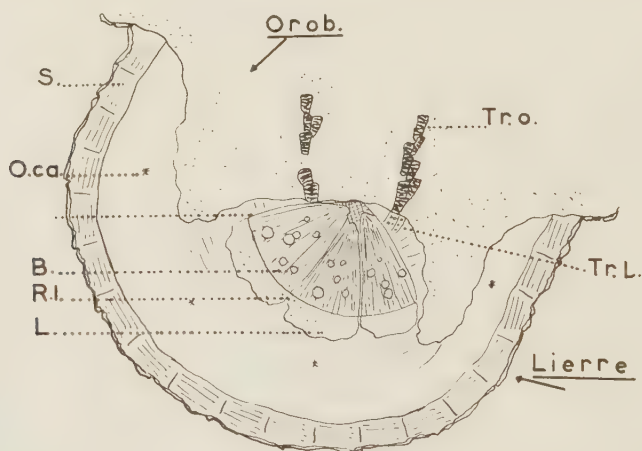


FIG. 19. — Le contact vasculaire s'effectue soit sur les trachéides du Lierre néoformées (Tr. L.), soit directement sur le bois secondaire (B.).

Coupes dans la zone de contact hôte-parasite, effectuées transversalement par rapport au Lierre.

physiologique normale du Lierre aux substances stimulantes qui diffuseraient des cellules méristématiques envahissantes.

En même temps que se produit cette hyperplasie des cellules parenchymateuses, le système vasculaire de l'hôte se modifie profondément.

Le bois de la racine du Lierre comprend normalement un anneau ligneux complet, interrompu par des files de cellules parenchymateuses [rayons ligneux (1), R. L. sur nos figures] disposées radialement jusqu'à la moelle (fig. 16 et 17).

Au niveau de la zone de fixation du parasite, et à mesure que cette racine croît et se développe, il se produit des fragmentations dans cet anneau de bois. Les rayons ligneux, qui, à l'état normal, ne sont formés que de une ou deux rangées de cellules, deviennent beaucoup plus importants et semblent s'écarter en face des cellules envahissantes (fig. 13 et 14). Quelquefois la lignification du Lierre est presque complètement morcelée et il ne subsiste qu'une zone ligneuse assez faible.

Cette dislocation des éléments vasculaires n'est pas le fait d'une lyse, mais d'une absence de formation ligneuse localisée à une zone plus ou moins étendue pendant la croissance de la racine.

Il y a une grande variation de détails dans cette désorganisation ligneuse, en relation sans doute avec le degré d'évolution de la racine de l'hôte au moment de la fixation du parasite.

Plus la racine est jeune à ce moment, plus la vascularisation est réduite au point de contact. Les cellules de l'assise génératrice libéro-ligneuse perdent, dans la zone stimulée, leurs caractères (fig. 18 et 19). Ce qui paraît donc à première vue comme une lyse de la lignine de l'hôte par les diastases du parasite, n'est donc, en fait, qu'une absence de formation vasculaire localisée en une certaine zone.

C. Contact vasculaire de l'Orobanche et du Lierre. — Le parasite ayant donc pénétré l'épiderme et le cortex du Lierre en progressant par divisions successives entre les cellules de l'hôte, arrive peu à peu dans la région vasculaire de ce dernier. En même temps, le tubercule se développe et, en son sein, certaines cellules à cytoplasme dense et à noyau plus volumineux se différencient pour former un cordon libéro-ligneux au centre même et dans l'axe du tubercule. Ce cordon libéro-ligneux n'est pas encore connecté aux tissus vasculaires de l'hôte ; il en est séparé par la masse des cellules en division de l'extrémité de l'haustorium (fig. 13, 14 et 18).

Lorsque ces cellules arrivent dans la zone du parenchyme vasculaire de l'hôte (ou rayon ligneux) certaines de ces cellules déjà plus allongées (fig. 13) épaississent leurs membranes au contact de l'Orobanche : un dépôt de lignine se forme, délimitant des ponctuations (fig. 20 et 21). Le premier contact vasculaire entre hôte et parasite est donc le fait de l'hôte, le Lierre. Cette différenciation de trachéides se produit à partir d'un tissu appartenant néanmoins à un parenchyme vasculaire, mais ayant perdu tout caractère (fig. 15 et 19). Ces trachéides sont d'ailleurs faiblement colorées par les réactifs habituels de la lignine ; cela est normal, puisque

(1) Nous employons l'expression « rayons ligneux » dans le sens défini par BOUREAU : « files horizontales de cellules parenchymateuses disposées radialement qui joignent la moelle au péricycle en traversant les formations libéro-ligneuses de l'appareil conducteur » (*loc. cit.*, 1954, t. I, p. 236).

ce sont des cellules néoformées. C'est cette différence de coloration du bois



FIG. 20. — Les premiers vaisseaux de bois qui apparaissent entre les deux partenaires sont les trachéides du Lierre (*Tr. L.*), formées à l'intérieur du rayon ligneux.

Comparer avec la figure 13, où on ne distingue encore aucune vascularisation. (G. $\times 120$.)

de l'hôte dans la zone de contact avec le parasite qui avait certainement amené quelques auteurs à supposer une digestion de la lignine par le parasite.

Presque simultanément, les cellules de l'Orobanche qui sont en contact direct avec les trachéides du Lierre s'épaississent et s'incrudent, à leur tour, de lignine. Ainsi s'effectue le contact vasculaire direct de cellule à cellule hôte-parasite, comme le montrent d'une façon évidente les figures 22 et 23.

Ces formations vasculaires de l'Orobanche sont différentes de celles du Lierre et, de ce fait, leur distinction est aisée. En effet, les trachéides du Lierre sont ponctuées, alors que dans celles de l'Orobanche les épaisissements de lignine sont réticulés.

Les trachéides (1) de l'Orobanche sont d'ailleurs assez semblables à celles qui se forment dans les tissus néoformés ou ceux qui ont été l'objet de traumatismes : les callus de cicatrisation, les *crown-galls*, les tissus de *Topinambour* cultivés *in vitro* en contiennent,

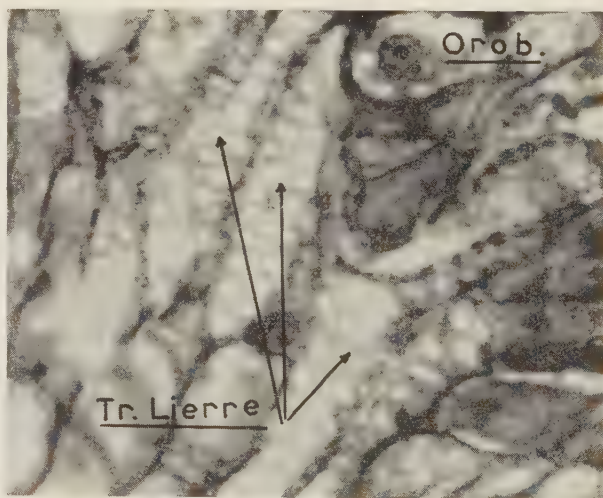


FIG. 21. — Détails des trachéides ponctuées du Lierre. (G. $\times 480$.)

Coupes effectuées dans la zone de contact hôte-parasite, longitudinalement par rapport au Lierre.

(1) Ces trachéides sont, le plus souvent, des trachéides vraies. Toutefois, dans certains cas, nous avons observé entre elles des perforations. Ces deux types de cellules vasculaires coexistent donc dans l'Orobanche du Lierre.

tissus qui renferment souvent des quantités assez élevées de substances de croissance. Les tissus d'Orobanche, au début de leur formation, ressemblent en effet aux cultures de tissus végétaux. Ils sont pareillement

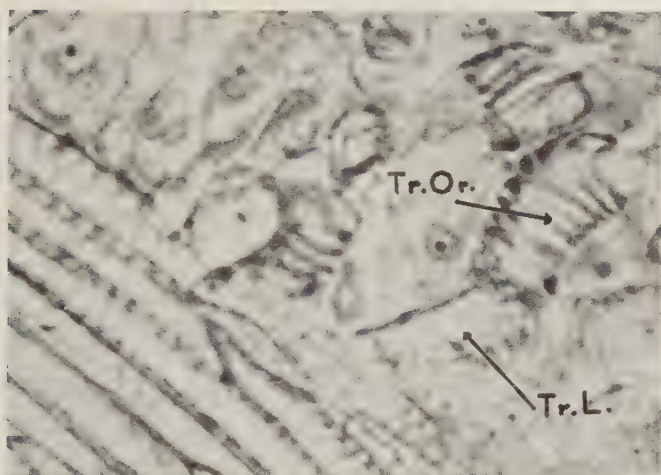
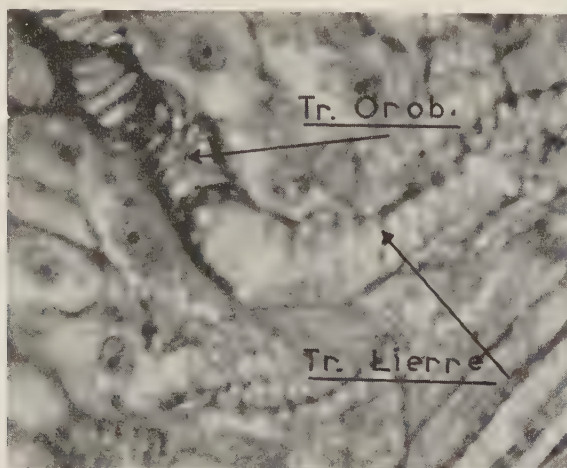


FIG. 22 et 23. — Le contact vasculaire entre les trachéides ponctuées du Lierre (*Tr. L.*) et les trachéides réticulées de l'Orobanche (*Tr. Or.*) se fait bout à bout. (G. $\times$ 480.)

constitués d'une masse cellulaire parenchymateuse où se différencient certaines zones cribrovasculaires formées de trachéides réticulées.

Les trachéides ponctuées du Lierre se différencient, avons-nous dit, sous l'influence de l'Orobanche.

Or, si nous effectuons des coupes dans les racines-crampons de tiges aériennes de Lierre, nous remarquons que la vascularisation de ces racines prend naissance là aussi, à la base d'un rayon ligneux de la tige. Certaines cellules de ce parenchyme s'incrument de lignine qui se dépose en délimi-

tant des ponctuations. Ces cellules sont exactement semblables à celles qui se différencient dans la racine parasitée par l'Orobanche. (Comparer les trachéides de la tige de Lierre, base de la vascularisation d'une racine-crampon fig. 24, et celles de la racine du Lierre déterminées par l'Orobanche fig. 21, 22 et 23).

Une fois les trachéides du Lierre formées, les trachéides de l'Orobanche

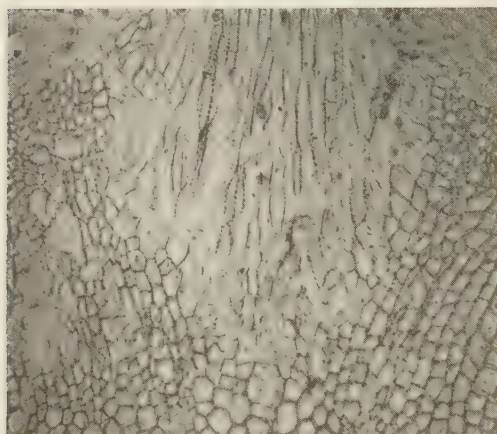


FIG. 24. — Coupe transversale effectuée dans une tige de Lierre, au niveau de la vascularisation d'une racine-crampon.

Comparer les trachéides ainsi formées avec celles des figures 21, 22 et 23, déterminées par la stimulation de l'Orobanche. (G. $\times 120$.)

se différencient donc à leur contact. A partir de celles-ci, un cordon vasculaire se constitue pour relier en une file ininterrompue de trachéides la vascularisation de l'hôte à la vascularisation déjà existante dans le cœur du tubercule de l'Orobanche (cf. fig. 14, 15, 18 et 19).

Il arrive parfois que, dans le rayon ligneux du Lierre, il ne se forme aucune lignification. Dans ce cas, les cellules méristématiques de l'Orobanche poursuivent leur marche dans ce parenchyme plus ou moins dissocié et ne différencient des trachéides qu'au contact du bois du Lierre (cf. fig. 25).

De toute façon, la lignification de l'Orobanche, à son point le plus extrême de progression dans l'hôte, ne se fait qu'au contact d'une cellule ligneuse préexistante. Il semble qu'il y ait comme une sorte d'induction de cellule à cellule pour déterminer cette lignification.

Le contact vasculaire ligneux entre l'Orobanche et le Lierre est donc assuré par action réciproque du parasite et de son hôte, ce dernier induisant, au point de jonction, la lignification du parasite.

Les coupes que nous venons d'étudier étaient réalisées dans le sens du grand axe du tubercule de l'Orobanche et transversalement par rapport à la racine du Lierre. Les coupes effectuées dans le même sens pour le parasite, mais longitudinalement par rapport à la racine, montrent d'une façon toute aussi nette cette connexion vasculaire (fig. 26).

Jusqu'à présent, nous n'avons porté notre attention que sur le système vasculaire ligneux dont la liaison hôte-parasite, évidente et spectaculaire, s'effectue d'ailleurs en premier lieu.

La soudure entre les libers des deux espèces est beaucoup moins apparente.

Les cellules libériennes de l'hôte dans la zone stimulée par le parasite sont allongées ; les cellules de l'Orobanche qui viennent à leur contact

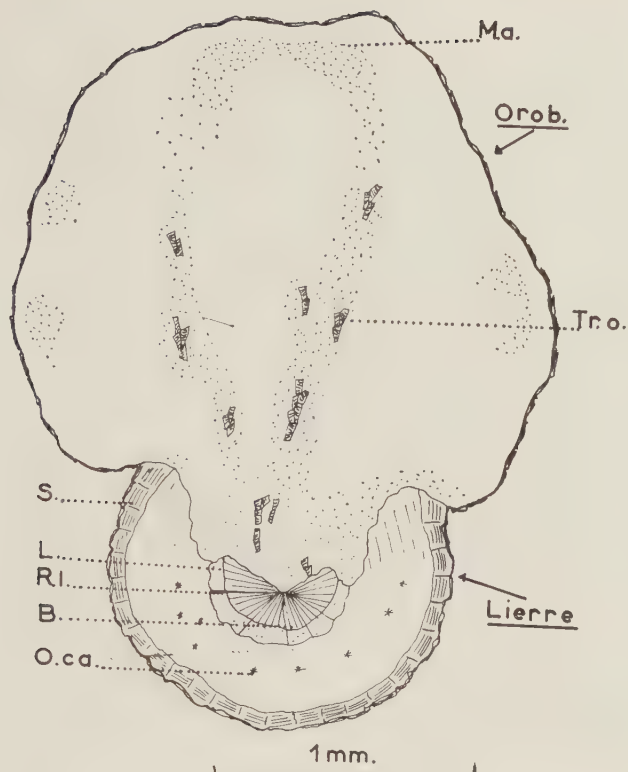


FIG. 25. — Coupe dans un tubercule d'Orobanche fixé sur une racine de Lierre.

Ici le Lierre n'a pas différencié de trachéides. Les trachéides du parasite se sont formées directement au contact du bois secondaire de l'hôte.

A l'intérieur du tubercule, la vascularisation de l'Orobanche s'organise jusqu'au méristème apical (*M. a.*) du bourgeon.



FIG. 26. — Connexion des trachéides ponctuées du Lierre (*Tr. L.*) aux trachéides réticulées de l'Orobanche (*Tr. Or.*).

s'allongent aussi dans le même sens, semblent prendre une structure identique et s'interpénétrer. Il est assez difficile de distinguer avec certitude les cellules de l'hôte de celles du parasite; dans les deux cas, ces cellules ont une forme presque identique. Le cytoplasme des cellules de l'Orobanche est néanmoins plus dense.

La liaison du phloème de l'hôte et du parasite se fait donc bien après celle du xylème; mais on n'aperçoit aucun tube libérien caractéristique dans les tissus de l'Orobanche au niveau de la zone de contact.

Nous sommes d'ailleurs en accord sur ce point avec les travaux de SCHUMACHER et HALBSGUTH (1938).

La question de la liaison des éléments libériens de l'hôte et du parasite s'est posée depuis de nombreuses années aussi pour la Cuscuta. Dans une note récente, TRUSCOTT (1958) indiquait : « Aucun tube libérien du parasite n'est vu atteindre le phloème de l'hôte. Si les tubes libériens de l'hôte et du parasite sont connectés, cette connexion n'est probablement pas directe, mais plutôt se fait au moyen de parenchyme suffisamment spécialisé à soutirer le matériel du liber de l'hôte » (*loc. cit.*, p. 174).

La soudure vasculaire étant réalisée, les cellules de l'Orobanche cessent peu à peu leur division et par là même la diffusion des substances déterminant l'hyperplasie des cellules sous-jacentes de l'hôte.

La progression du parasite s'arrête donc, mais ses cellules conservent toujours à la périphérie leur aspect caractéristique avec un noyau assez volumineux et un cytoplasme dense.

D. Considérations sur les relations hôte-parasite. — Les nombreuses observations effectuées sur la fixation d'*Orobanche Hederæ* sur son hôte, le Lierre, nous amènent à formuler les remarques suivantes :

I. TOUT D'ABORD AU POINT DE VUE PÉNÉTRATION. — On n'observe aucune perforation ni passage du parasite sous forme amiboïde dans les cellules de l'hôte, comme c'est le cas dans *O. crenata* d'après KADRY (1956).

De même, on ne voit aucune « lyse » enzymatique des cellules de l'hôte par des diastases que sécréterait le parasite.

Ce principe même de « digestion » nécessaire pour qu'une cellule ou un ensemble cellulaire pénètre dans un tissu, nous le retrouvons d'ailleurs d'une façon tout à fait analogue dans les idées exprimées par VAN TIEGHEM et DOULIOT (1888) au sujet des processus de développement des radicelles chez les angiospermes. (Nous ne bornons cette comparaison qu'au principe même de la progression d'une masse cellulaire en multiplication dans un parenchyme.)

Voici donc ce qu'on lit dans le *Traité de Botanique* de VAN TIEGHEM (1891) : « Les radicelles ont, pour sortir de la racine mère, à traverser l'écorce. Cette traversée se fait toujours par digestion. En effet, la jeune radicelle attaque et dissout de proche en proche, à l'aide d'un liquide diastatique, toutes les cellules corticales qu'elle vient à toucher, d'abord leur contenu protoplasme, noyau, amidon, etc., puis leur membrane

cellulosique ; elle en absorbe à mesure toute la substance liquide ou liquéfiée, et croît en même temps, de manière à remplir l'espace devenu libre. C'est donc par le fait même de sa nutrition et de sa croissance interne que la radicelle se fraie un chemin vers l'extérieur. Ordinairement, l'action dissolvante se limite aux cellules corticales qui sont directement en contact avec la radicelle. Quelquefois, cependant, le liquide chargé de diastases s'épanche et pénètre l'écorce tout autour dans un rayon plus ou moins étendu : la digestion s'exerce alors à distance » (*loc. cit.*, tome I, p. 709).

Cette conception de VAN TIEGHEM est restée très longtemps classique et s'est transmise presque intégralement dans beaucoup d'ouvrages de botanique parus jusqu'à ce jour.

Néanmoins certains auteurs jetèrent quelques doutes sur l'explication de ce processus. MANGENOT en étudiant les radicelles de *Pisum sativum* L. « n'avait trouvé trace ni de poche digestive, ni de phénomènes digestifs autour des ébauches de radicelles » (*loc. cit.* par BERTHON, p. 308).

Et BERTHON, en 1943, faisait part d'observations exactement semblables : « Les cellules corticales entourant l'ébauche (de la radicelle) ne sont altérées, ni dans leur cytoplasme, ni dans leur noyau, comme le démontre l'étude cytologique... Les cellules corticales que VAN TIEGHEM considérait comme des cellules en voie de digestion, sont au contraire, en voie de prolifération... Elles se différencient pour devenir méristématiques... Seules les deux ou trois assises corticales les plus extrêmes sont rompues lorsque, par suite de la prolifération de ces cellules, la radicelle sort à l'extérieur... mais sans aucun indice de processus digestif... dont VAN TIEGHEM n'a donné dans son mémoire aucune preuve histologique, cytologique ou physiologique » (*loc. cit.*, p. 309).

La pénétration de l'Orobanche dans les tissus du Lierre pourrait être assimilée, d'après nous, à la progression d'un tissu méristématique très actif entre des cellules parenchymateuses normales.

II. AU POINT DE VUE LIAISON VASCULAIRE, on ne rencontre pas dans l'Orobanche du Lierre le même type de fixation parfaitement analysé par MANGENOT (1947) chez une autre plante holoparasite appartenant à la famille des Balanophoracées.

Dans cette espèce (*Thonningia coccinea* Vahl.), dès que l'adhérence est réalisée entre la racine de l'hôte et le parasite, l'hôte pénètre dans l'écorce du parasite par des éléments de son parenchyme cortical. Autour de ce massif de cellules étrangères, les cellules du parasite réagissent ; très rapidement un complexe mixte s'organise, qui devient un cordon absorbant à structure radiculaire dans lequel le système libéro-ligneux est formé par l'hôte et l'écorce par les tissus du parasite.

Nous ne retrouvons pas ces sortes de chimères dans l'Orobanche où la délimitation des tissus de l'hôte et du parasite est nette et où les systèmes vasculaires se rejoignent et se raccordent presque bout à bout.

Pour l'espèce qui nous préoccupe tout au moins, ce raccordement n'est nullement le fait d'une aspiration mécanique des trachéides de l'hôte par

le vide se trouvant dans le testa de la graine, comme l'explique KRENNER (1958) à propos d'*O. cumana*.

Nous le comprenons comme une connexion physiologique qui se ferait sous l'influence de substances hormonales diffusées par les tissus du parasite, exactement comme dans le cas d'une greffe.

III. ANALOGIES EXISTANT ENTRE LA FIXATION DU PARASITE ET UNE GREFFE. — En effet, les phénomènes qui se manifestent dans la fixation du tubercule de l'Orobanche sur la racine du Lierre sont analogues en de nombreux points à ceux que présentent une greffe : le greffon étant l'Orobanche et le sujet le Lierre.

Dans une greffe :

1° On assiste à la réorganisation cambiale du sujet, qui est vraisemblablement induite à distance par le greffon ;

2° Entre les deux organismes, les éléments ligneux néoformés sont des trachéides réticulées pourvues ou non de ponctuations ;

3° Les tissus vasculaires de jonction qui vont permettre l'établissement d'une seule unité à partir des deux composants de la greffe sont des productions simultanées des deux partenaires ;

4° L'union de ces vaisseaux se fait rigoureusement vis-à-vis et l'on est logiquement amené à penser à des phénomènes d'induction.

(D'après HOMES, *Contribution à l'étude histologique de la greffe de Gossypium hirsutum L.*, 1958.)

Pareillement, dans la fixation de l'Orobanche sur le Lierre :

1° On assiste à l'hyperplasie et à l'hypertrophie des cellules de l'hôte dans la zone stimulée par le parasite (ces réactions ne semblent pas particulières à l'Orobanche et sont signalées aussi dans le genre *Viscum* par THODAY (1958) et dans le genre *Cuscuta* par TRUSCOTT (1958) ;

2° Les éléments ligneux qui se forment entre les deux partenaires sont des trachéides, réticulées pour l'Orobanche et ponctuées pour le Lierre ;

3° Au point de vue vasculaire tout au moins, l'union se fait bout à bout et par production presque simultanée des trachéides de l'hôte et du parasite.

Les premières trachéides formées appartiennent au Lierre ; directement au-dessus, et à leur contact, se différencient les trachéides de l'Orobanche, qui, par la suite, vont se raccorder par lignification d'une file méristématique préexistante aux trachéides du tubercule situées au-dessus.

NICKELL, en 1948, s'inspirant de recherches précédentes de CAMUS, parvint à greffer des bourgeons de *Melilotus albus* Medik. (Légumineuse) sur le parenchyme médullaire de jeunes tiges d'*Helianthus annuus* L. (Composées). Il obtint une soudure convenable entre le greffon et le sujet, ainsi qu'un développement appréciable du greffon. L'étude anatomique de ces plantes greffées lui révéla que le bourgeon de Mélilot induit la formation d'éléments cribro-vasculaire dans le parenchyme médullaire de la tige de Soleil, ce qui démontre que les facteurs histogènes sécrétés par les méristèmes en voie de croissance ne sont pas spécifiques.

Ces phénomènes d'induction signalés par HOMES et par NICKELL dans l'union greffon-sujet ont été d'ailleurs démontrés d'une façon rigoureuse par CAMUS, en 1949, par des greffes effectuées *in vitro* de bourgeons sur des tissus d'Endive et interposition, entre les deux tissus, d'une pellicule de cellophane.

Ses travaux ont établi que « les bourgeons exercent sur les tissus sous-jacents une action histogène polarisée, se traduisant par une dédifférenciation progressive, suivie d'une redifférenciation de formations conductrices. L'ensemble de ces phénomènes s'oriente obliquement d'ailleurs vers la zone d'explantation » (*loc. cit.*, p. 186).

CAMUS a démontré ensuite d'une manière irréfutable que des bourgeons en voie de croissance et, en particulier, leurs méristèmes, sécrètent des substances diffusibles capables de déterminer des processus d'histogenèse. « Suivant la concentration hormonale présente à un niveau déterminé, on observerait soit un phénomène de multiplication cellulaire, soit le même phénomène, accompagné d'une différenciation de formations vasculaires » (*loc. cit.*, p. 182).

Dans nos observations, nous avons remarqué aussi l'influence qu'exerce la zone méristématique de l'haustorium de l'Orobanche sur les tissus sous-jacents du Lierre.

Ceci se traduit par :

1° Une division active des cellules corticales du Lierre, provoquant ainsi l'hypertrophie de la racine-hôte autour du parasite ;

2° Une absence de fonctionnement de l'assise cambiale de l'hôte (ce qui détermine dans le cylindre central un rayon ligneux plus ou moins large), puis un allongement des cellules de ce rayon en direction du parasite et la formation de trachéides dans ce tissu.

Les cas observés où l'hôte ne produit pas de trachéides dans la zone stimulée par l'Orobanche pourraient donc être interprétés comme relevant d'une concentration hormonale trop faible pour amener une différenciation vasculaire.

Ce problème de concentration hormonale semble avoir été étudié chez la Cuscuta.

GUSTAFSON, en effet, en 1946, avait entrepris l'analyse des tissus de *Cuscuta polygonata* et de sa plante hôte, *Impatiens Balsamina* L. et trouvé un taux élevé d'auxine dans la région de connexion hôte-parasite. Il en concluait que l'union du parasite avec l'hôte mettait en jeu des réactions qui accroissaient l'hormone dans les deux tissus.

Il ne nous a pas été possible, pour le moment, d'effectuer des dosages de substances de croissance dans la zone de contact Orobanche-Lierre. Cela amènerait une démonstration probante de ces phénomènes, qui ne se manifestent à nous que par des modifications cytologiques.

Cette comparaison que nous avons faite de la fixation du tubercule d'Orobanche sur la racine de la plante hôte avec le greffage d'un bourgeon ne peut évidemment être suivie d'une façon rigoureuse.

Beaucoup d'éléments sont certes comparables : phénomènes de diffé-

renciation dans le sujet déterminés par le greffon, vascularisation réciproque et bout à bout, soudure intime des deux organismes, etc. Mais les processus de pénétration et de progression des cellules de l'Orobanche dans les tissus du Lierre sont bien spécifiques de l'action parasitaire.

Néanmoins, il nous semble possible d'interpréter cette fixation comme une greffe active et physiologique.

Cette conception rejoint d'ailleurs en partie les idées émises, en 1920, par R. CHODAT dans ses *Principes de Botanique* : « Il devient très probable que, primitivement, ce sont des greffes accidentelles entre plantes vertes qui ont initié le parasitisme; puis, la soudure étant établie, le greffon, parasitant par ses suçoirs, se trouve dans des conditions qui rendent inévitable une diffusion des matières élaborées » (*loc. cit.*, p. 520). Cette phrase pose le problème de l'origine du parasitisme des plantes sans chlorophylle.

Des hypothèses sont seules permises tant que des expériences rigoureuses ne seront pas effectuées.

Afin de vérifier et de prouver d'une façon expérimentale notre conception, nous avons effectué de très nombreux essais de greffage de fragments d'organes d'*O. Hederæ* (points végétatifs et très jeunes tubercules) sur la plante hôte, le Lierre, et même sur plusieurs autres espèces (*Viburnum tinus* L., *Laurus nobilis* L., *Pelargonium* sp.).

Malgré l'ensemble de précautions prises, nous n'avons pu, dans aucun cas, obtenir la survie et la prise des greffons.

La diffusion et l'oxydation des substances phénoliques qui a lieu dès la moindre section des tissus de l'Orobanche est certainement un facteur important, déterminant l'inhibition de la multiplication cellulaire.

Nous rejoignons dans ces essais les mêmes tentatives infructueuses de MULLER (1941) qui avait déjà essayé de greffer de très jeunes tiges d'*O. crenata* et d'*O. ramosa* sur leurs hôtes.

Si l'on admet le principe de la greffe accidentelle initiale comme origine du parasitisme, on peut se demander si la décoloration des phanérogames parasites est l'effet ou la cause du parasitisme.

D'après R. CHODAT : « il paraît probable que la chlorose est primaire, c'est-à-dire que l'incapacité de produire suffisamment de chlorophylle s'est traduite chez les végétaux de diverses familles par un saprophytisme ou un parasitisme obligatoire » (*loc. cit.*, p. 532).

Nous pensons qu'il ne serait peut-être pas impossible que la perte de chlorophylle fut au contraire secondaire, celle-ci intervenant après la « greffe accidentelle initiale ».

On pourrait concevoir qu'une greffe accidentelle aurait jadis fixé une Scrofulariacée chlorophyllienne sur une plante verte. La greffe étant réussie, une matière nutritive abondante serait alors passée dans le système vasculaire du greffon et aurait déterminé la régression des plastes donnant naissance aux Rhinanthacées ou même la perte totale du pigment chlorophyllien, et les Orobanchacées auraient eu là leur origine.

Le problème nutritif ne serait peut-être pas le seul en cause et l'ébran-

lement métabolique causé dans le greffon par le greffage lui-même aurait pu aussi contribuer à induire la perte de chlorophylle.

Mais on ne peut formuler que des hypothèses avant que les expériences de nutrition de l'Orobanche hors de la plante-hôte ne soient réussies.

EN RÉSUMÉ : 1° Nous avons obtenu pour la première fois *in vitro* la fixation d'un filament germinatif d'Orobanche *Hederæ* sur une plantule de Lierre.

La fixation du filament germinatif de l'Orobanche se fait sur de très fines radicelles de l'hôte.

Le développement des tissus parasites à l'intérieur du Lierre est très lent (2 mm en trois mois) et de profondes modifications ont le temps de s'opérer dans la vascularisation de l'hôte.

2° Dès que la pénétration est effectuée, les cellules méristématiques de l'extrémité du filament germinatif de l'Orobanche déterminent probablement par diffusion de substances hormonales la division des cellules corticales produisant l'hypertrophie de la racine du Lierre et l'arrêt du fonctionnement des cellules cambiales de l'hôte qui sont directement sous-jacentes.

Ces cellules, ne produisant plus de bois ni de liber, se divisent et en même temps s'allongent en direction des cellules stimulantes.

3° Les cellules de l'Orobanche pénètrent dans les tissus du Lierre par divisions successives mais lentes et progressent ainsi entre les cellules de l'hôte ;

4° En même temps que s'effectue la progression du parasite, la partie de l'Orobanche restée en dehors de la racine de l'hôte se transforme en tubercule.

Quelques cellules au centre de ce tubercule se différencient en une colonne cribro-vasculaire non encore reliée aux vaisseaux du Lierre. Cette différenciation a lieu alors que le tubercule est encore très petit ;

5° Dès que le parasite arrive dans le parenchyme ligneux de l'hôte, certaines cellules de celui-ci se différencient en trachéides ponctuées ;

6° Parallèlement et à leur contact, certaines cellules de l'Orobanche s'incrustent aussi de lignine et prennent la forme de trachéides réticulées.

Dès que la liaison vasculaire est réalisée entre hôte et parasite, des trachéides se différencient dans l'Orobanche pour relier en une ligne ininterrompue la colonne vasculaire du cœur du tubercule au bois de l'hôte.

7° Une fois le contact ligneux effectué, le liber du Lierre et les cellules allongées de l'Orobanche s'interpénètrent.

Ces cellules à cytoplasme dense n'ont pas de cribles.

8° La progression du parasite s'arrête après la juxtaposition des deux systèmes vasculaires homologues.

Les cellules de l'Orobanche cessent peu à peu leur division. La délimitation des tissus des deux partenaires est toujours nette.

9° Il y a une très grande analogie, la progression cellulaire mise à part,

entre la fixation du tubercule d'Orobanche sur le Lierre et les phénomènes qui se manifestent dans une greffe.

Tout comme dans la greffe d'un bourgeon sur un porte-greffe, on peut faire, sur la fixation du tubercule de l'Orobanche sur son hôte, les observations suivantes :

a. L'Orobanche « exerce sur les tissus sous-jacents (du Lierre) une action histogène polarisée, se traduisant par une différenciation progressive, suivie d'une redifférenciation de formations conductrices ».

L'ensemble de ces phénomènes s'orientent obliquement d'ailleurs vers la zone d'implantation du parasite.

b. Entre les deux organes, les éléments ligneux néoformés sont des trachéides réticulées ou ponctuées ;

c. Les tissus de jonction qui vont permettre l'union des deux espèces sont des productions simultanées des deux partenaires ;

d. L'union vasculaire se fait bout à bout, et on est logiquement amené à penser à des phénomènes d'induction.

3° Le développement de l'Orobanche du Lierre.

Étude morphologique et anatomique de l'appareil végétatif.

Les problèmes morphologiques et anatomiques posés par le développement du tubercule et de l'appareil végétatif des Orobanches ont été certainement les mieux étudiés chez ces phanérogames parasites.

Le premier travail effectué en ce sens fut entrepris en 1845 par DUCHARTRE, qui décrivait l'anatomie de la tige d'*Orobanche Eryngii* Vaucher.

Puis, successivement, LORY (1847), CASPARY (1854), CHATIN (1856), SOLMS-LAUBACH (1868), KOCH (1887), HOVELACQUE (1888), BECK-MANNAGETTA (1895), TATE (1925), JULIANO (1935), KADRY et TEWFIC (1956) et KRENNER (1958) s'intéressèrent à ces questions.

Néanmoins, l'Orobanche du Lierre ne semble pas, à notre connaissance, avoir fait l'objet de nombreuses recherches.

KOCH et HOVELACQUE ont surtout bien suivi la morphologie et l'anatomie d'*Orobanche Epithymum*, *O. minor*, *O. cruenta* et *O. speciosa*, relevant certaines différences de structure avec *O. Hederæ*.

Seul, TATE en a fait l'objet particulier de sa thèse : son étude est exacte, mais parfois incomplète.

Aussi allons-nous nous borner à exposer nos observations personnelles dans la mesure où celles-ci apportent des connaissances nouvelles sur ce sujet ou, tout au moins, confirment certains points particuliers sur lesquels les opinions des auteurs ne semblent pas concorder.

1° Le suçoir de l'Orobanche ou haustorium. Sa valeur morphologique.

Nous avons, dans le chapitre précédent, suivi la pénétration de l'extrémité

du filament germinatif à travers les tissus du Lierre jusqu'à la jonction des éléments vasculaires des deux partenaires.

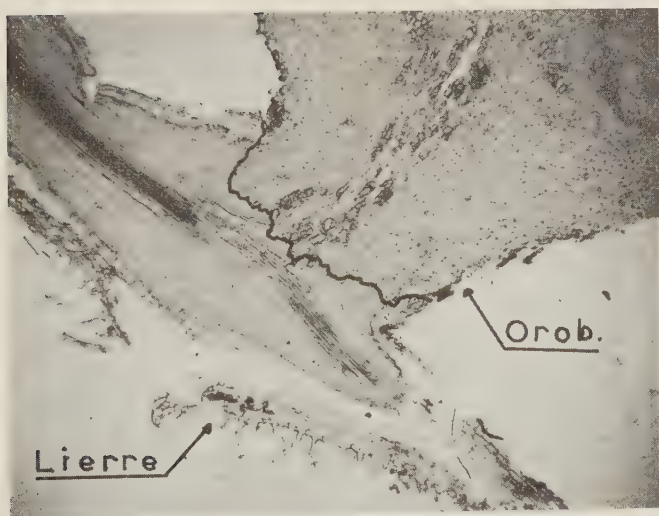
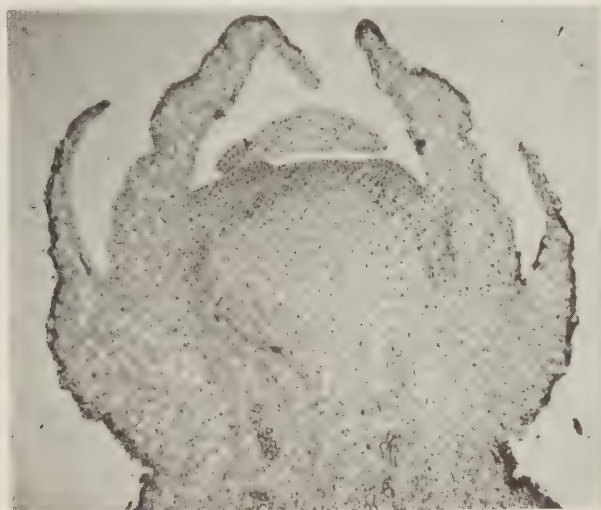


FIG. 27. — Jeune Orobanche fixée sur une racine de Lierre.

Les cellules restées méristématiques dans le cœur de l'Orobanche se différencient pour former un cordon vasculaire plus ou moins continu depuis le suçoir jusqu'aux méristèmes apicaux.

L'ensemble des tissus de l'Orobanche qui se trouvent à l'intérieur de la racine-hôte forment le suçoir ou haustorium (fig. 27).

Le suçoir des plantes parasites a fait l'objet d'études très nombreuses et variées afin de préciser sa valeur morphologique.

Une coupe effectuée transversalement par rapport au système vasculaire de cet organe nous montre des trachéides plus ou moins dispersées et

entourées de petites cellules à noyaux volumineux, qui, dans les parties supérieures de la plante, formeront le liber. Il n'y a pas de zone cambiale nette, ni d'indication d'un sens dans le développement du bois. Les vaisseaux du bois ou trachéides sont tous à peu près de la même taille et se sont différenciés d'une façon identique au contact des vaisseaux du Lierre.

Pour KOCH (1887), « le suçoir primaire est une racine modifiée ; ce serait l'homologue de la racine principale des autres plantes » (cité par HOVELACQUE, p. 559), et, pour HOVELACQUE (1888), « la valeur morphologique du suçoir des Orobanches est, en général, au-dessous de la valeur d'une racine. C'est une sorte de thalle qui présente un cordon libéro-ligneux élargi à ses deux extrémités au contact de la racine nourrice et à celui de la racine support » (*loc. cit.*, p. 609).

Si nous considérons la structure anatomique du suçoir d'*O. Hederæ*, nous n'observons ni coiffe, ni différenciation ligneuse nettement définie et encore moins de poils absorbants.

Mais aucun de ces caractères généraux n'a de valeur absolue. L'anatomie ne fixe pas l'identité d'un organe. Ce qui distingue fondamentalement un organe, c'est son rôle physiologique (EMBERGER, 1952).

Or, ici, le suçoir, c'est-à-dire l'ensemble des tissus de l'Orobanche directement implantés dans le Lierre, a pour fonction, tout comme une racine, d'absorber les substances nutritives du milieu extérieur, en l'espèce la racine-hôte.

Nous pouvons, en conséquence, assimiler réellement cet appareil à la racine principale des autres plantes.

2^o Le jeune tubercule. — La partie de l'Orobanche qui se trouve à l'extérieur de la racine-hôte s'accroît régulièrement et forme une petite masse ovale plus ou moins sphérique qui est le jeune tubercule (cf. fig. 8 A).

Dans les très jeunes stades, le corps du filament se trouve desséché, fixé sur l'extrémité du tubercule (fig. 8) et souvent encore enclos dans le testa de la graine.

Cette croissance est, au début tout au moins, très lente puisque son diamètre, au bout de quatre-vingt-dix jours, atteint à peine 2 mm.

Si l'on suit son développement, on voit bientôt apparaître à la base et à la périphérie de ce tubercule de petites protubérances coniques, hérissant peu à peu tout le tour. Ces petites protubérances s'accroissent par la suite pour donner les racines (fig. 28, 29 et 30).

Un peu plus tard, un ou plusieurs foyers histogènes se forment près du sommet du tubercule et, rompant la coiffe qui les recouvre, apparaissent les bourgeons d'où sortiront les hampes florales de l'Orobanche (fig. 28).

Nous allons tout d'abord entreprendre l'étude de ces racines dont un certain nombre de points méritent, à notre avis, d'être précisés.

A. Les racines d'Orobanche *Hederæ*. — Les protubérances coniques se développant à la base du tubercule ont chacune une épaisseur moyenne de 1 à 2 mm, et au maximum 1 ou 2 cm de long (fig. 29).

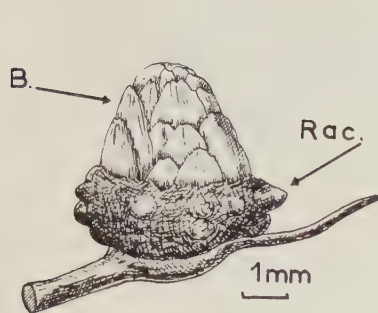


FIG. 28.

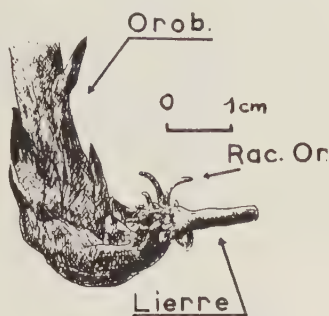
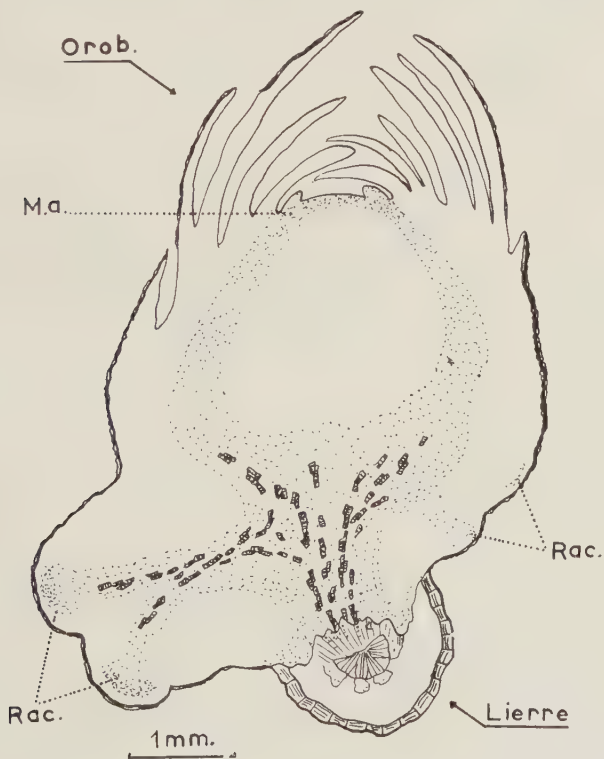


FIG. 29.

FIG. 28. — Jeune tubercule d'*O. Hederæ*, dont le bourgeon (B) apparaît après avoir déchiré la couche épidermique externe. A la base, les protubérances coniques, début de formation des racines (Rac.).

FIG. 29. — Racines d'Orobanche (Rac. Or.) développées à la base d'une hampe florale.

FIG. 30. — Coupe d'un jeune tubercule d'*O. Hederæ*.

Rac. : Zones méristématiques des racines.

M. a. : Méristème apical du bourgeon.

Il y a déjà une différence importante dans la taille de ces racines et celles d'autres espèces. Dans *O. crenata*, d'après KADRY et TEWFIC (1956 a), elles peuvent avoir 5 cm de long et nous avons mesuré nous-mêmes des racines d'*O. Epithymum* atteignant près de 8 cm.

Un point important est à établir : ces organes sont-ils vraiment des racines et quel est leur rôle ?

Selon les auteurs précédents (KOCH, HOVELACQUE, GRANEL, TATE et KRENNER), ce sont réellement des racines.

Mais, par contre, pour beaucoup d'autres, ce sont soit des pseudo-

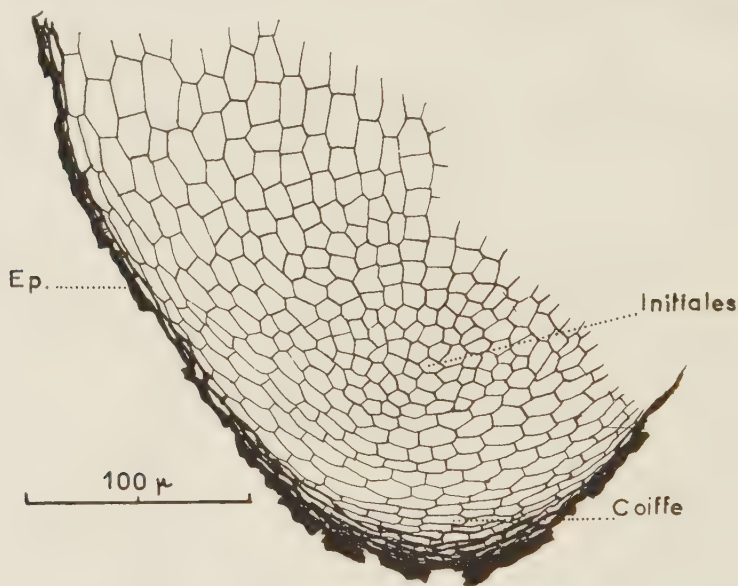


FIG. 31. — Coupe longitudinale de l'extrémité d'une racine d'*O. Hederæ*. (Ep. : Épiderme subérisé.)

racines (BLANCHARD), des *root-like organs* (KADRY et TEWFIC), des rhizomes (JULIANO), soit même de simples prolongements ou ramifications du tubercule (VELENOVSKY).

En étudiant tout d'abord leur mode de formation par des coupes effectuées dans le tubercule lui-même, nous remarquons que ces organes prennent naissance à partir de certaines cellules sous-épidermiques qui, en se recloisonnant, donnent un méristème.

Une coupe longitudinale faite dans l'extrémité d'une racine en développement montre un sommet conique à l'intérieur duquel se trouve, non pas des initiales déterminées, mais un groupe d'initiales où il est difficile de distinguer nettement les cellules allant donner naissance au plérôme, périblème et dermatogène (fig. 31).

TATE et KADRY ne donnent aucune indication à ce sujet, -seul HOVELACQUE, fait sur *O. minor* une observation semblable à la nôtre.

Sous ce groupe d'initiales se trouvent un ensemble de cellules allongées

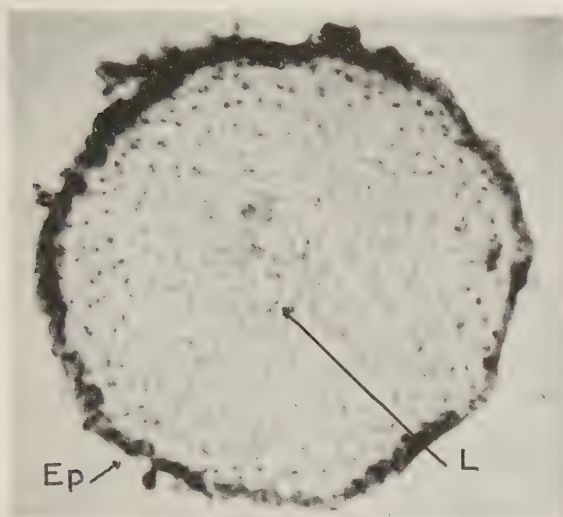


FIG. 32. — Coupe transversale dans une racine d'*O. Hederæ* effectuée au-dessus des initiales, montrant l'apparition des premiers éléments libériens (L.). (G. $\times 200$.)

Ep. : Épiderme subérisé, sans aucun poil absorbant.

tangentiellement par rapport à la surface et dont les membranes extérieures se subérisent. Les assises externes, progressivement déchirées par la croissance interne, se séparent et se détachent en feuillets.

Ce tissu, situé à l'extrémité apicale de la racine et sous le prolongement des cellules épidermiques, nous paraît être réellement une coiffe, mais une coiffe adhérant intimement à l'épiderme et ne s'exfoliant que cellule par cellule.

Les observations des auteurs sont assez partagées : si KADRY et TEWFIC (1956 a) n'ont observé aucune coiffe dans *O. crenata*, SOLMS-LAUBACH, KOCH et BECK-MANNAGETTA affirment néanmoins sa présence plus ou moins tardive dans plusieurs espèces.

Assez loin du sommet végétatif, on rencontre des trachéides réticulées, isolées ou juxtaposées et ne formant que plus loin, et encore par endroits seulement, une ligne continue.

L'épiderme autour de la racine est constitué de cellules allongées ; les plus extérieures sont subérisées et s'exfolient une par une. A aucun moment on ne rencontre de couche cellulaire pouvant faire penser à une assise

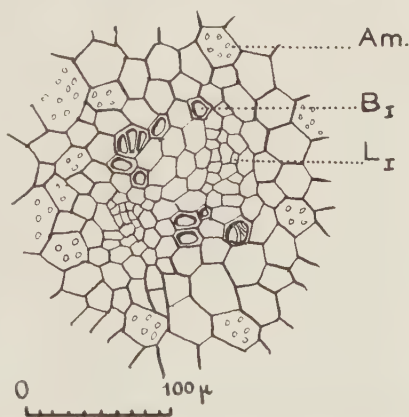


FIG. 33. — Coupe transversale effectuée dans une jeune racine d'*O. Hederæ*. Structure diarche.

B₁ : bois primaire ; L₁ : liber primaire ; Am : amidon.

pilifère. Aucune cellule ne se prolonge extérieurement et toute la surface extérieure de la racine est complètement subérisée.

La perméabilité est probablement très réduite. Nous ne pensons donc pas que cet organe, tout au moins chez *O. hederæ*, puisse absorber directement de l'eau ou des substances minérales.

Une étude plus précise fut entreprise par une série de coupes transversales effectuées depuis l'extrémité jusqu'à la base de la racine.

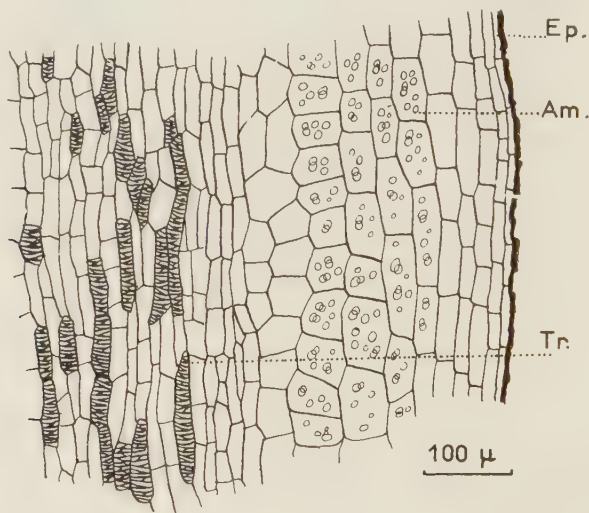


FIG. 34. — Coupe longitudinale effectuée dans une racine d'*O. Hederæ*. Les trachéides (*Tr.*) sont très rarement superposées.

Dans toutes les régions observées, l'épiderme est toujours semblable avec des cellules allongées et subérisées, s'exfoliant en partie.

Les coupes passant au-delà des initiales et au-dessous des formations ligneuses (fig. 32), montrent les premiers éléments vasculaires en formation. Les cellules de la zone corticale ne contiennent pas d'amidon. Ce dernier n'apparaît dans le cortex qu'au niveau des premières trachéides (fig. 33).

A ce moment, on observe un ilot vasculaire formé de deux pôles ligneux alternant avec deux pôles libériens.

Les trachéides sont d'ailleurs presque toujours de taille sensiblement identique et assez rarement superposées en coupe longitudinale (fig. 34) et cela même dans les formations secondaires bien évoluées.

Néanmoins, dans les coupes effectuées dans la partie médiane de la racine, les pôles du bois sont quelquefois au nombre de quatre et convergent vers le centre (fig. 35).

Le liber alterne avec le bois et détermine une structure caractéristique de racine primaire. Par endroits, à la base du liber, apparaissent les premières divisions cambiales.

Le péricycle et l'endoderme sont peu différenciés.

Légèrement plus haut près du tubercule, une zone cambiale s'est multipliée activement et nous voyons apparaître les premières formations secondaires (fig. 36). Le liber primaire est rejeté à l'extérieur et écrasé par le liber secondaire. Le bois primaire persiste d'ailleurs toujours.

Dans les coupes passant au niveau du point de sortie de la racine, la

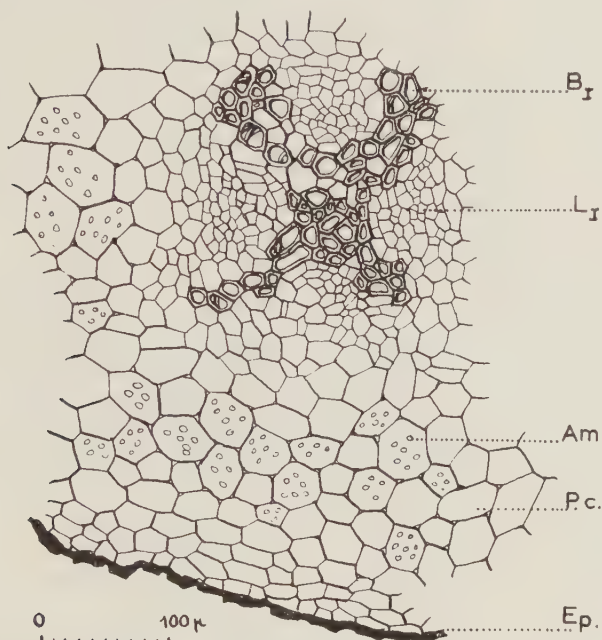


FIG. 35. — Coupe transversale effectuée dans la partie médiane d'une racine d'*O. Hederæ*.

Structure tétrarche avec convergence au centre des trachéides. (P. c. : parenchyme cortical.)

structure est alors complètement secondaire ; une assise cambiale détermine de part et d'autre un cercle complet.

Néanmoins, les cellules du bois secondaire sont toujours constituées de trachéides réticulées, formant quelquefois une file de deux ou trois cellules ligneuses, mais rarement plus.

Il n'y a jamais de fibres ou de cellules scléreuses.

Ainsi donc, d'après sa vascularisation, nous pouvons considérer cet organe comme une véritable racine : nous avons vu apparaître, à l'origine, une structure primaire avec deux ou quatre pôles de bois alternant avec des pôles libériens ; puis une assise cambiale détermine la formation d'une véritable structure secondaire en délimitant un anneau continu de bois et de liber, repoussant de part et d'autre les éléments primaires.

Ces formations secondaires semblant exister rarement dans les organes d'autres espèces, puisque KOCH indique qu'une « légère croissance secondaire est possible » dans les racines d'*O. minor*, et HOVELACQUE remarque que « les productions secondaires sont presque nulles, bien qu'il y ait indication d'une zone cambiale (*O. cruenta*) (*loc. cit.*, p. 591).

Il faut toutefois faire certaines réserves et indiquer qu'il existe quelques différences avec une racine de dicotylédone normale. Le bois est toujours formé de trachéides réticulées larges et courtes, depuis l'extrémité jusqu'au point de sortie de la racine du tubercule.

Ces trachéides sont légèrement plus longues dans les formations secon-

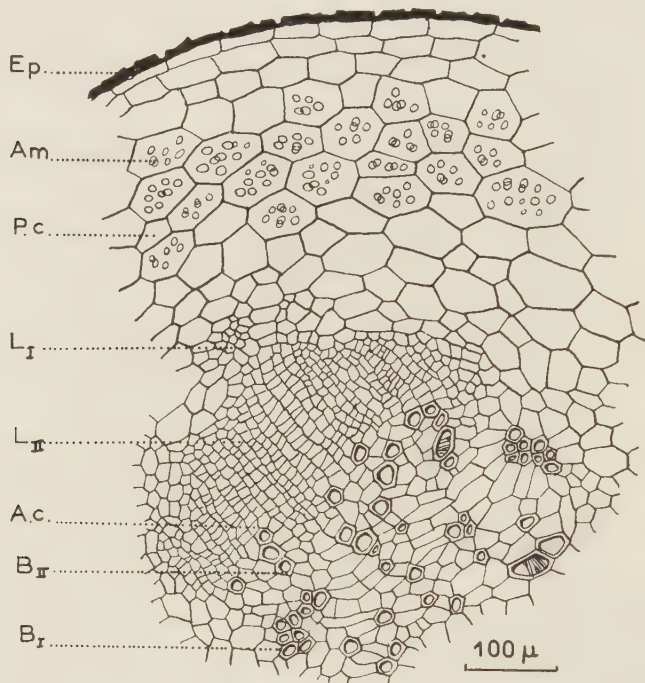


FIG. 36. — Coupe transversale effectuée dans la partie supérieure d'une racine d'*O. Hederæ*, début des formations secondaires.

dares, leur taille pouvant atteindre près de $200\ \mu$ de long sur $30\ \mu$ de large.

Il n'y a jamais de vaisseaux annelés, spiralés ou ponctués et surtout, en aucun point de l'épiderme subérisé, n'apparaît de formation qui puisse indiquer une assise pilifère absorbante.

Ces racines semblent, d'après nous, n'avoir aucun rôle.

Nous les considérons, dans le cas de l'Orobanche du Lierre tout au moins, comme des organes sans fonction.

Il n'en est pas de même, en effet, dans la plupart des autres espèces d'Orobanche où ces racines peuvent « infecter » les racines de l'hôte et produire des suçoirs secondaires.

Selon HOVELACQUE, « lorsqu'une racine d'Orobanche vient à rencontrer une racine nourrice et que le contact est limité à un très petit point, la cellule « pilifère » du parasite qui est touchée, grandit, s'hypertrophie et pénètre entre les cellules de la racine nourrice pour former un haustorium secondaire » (*loc. cit.*, p. 598).

Personnellement, en accord avec TATE, nous n'avons observé aucun cas de connexions secondaires de ces racines avec l'hôte.

Il existe d'ailleurs une autre espèce d'Orobanche où ces racines ne sont pas fonctionnelles.

« Dans *O. Rapum*, au premier abord, les tubercules paraissent dépourvus de racines. Il en existe cependant de très nombreuses, mais qui restent enfouies à la base du tubercule et que nous n'avons jamais vu venir à sa surface. Ces racines, toujours extrêmement courtes, rudimentaires, sont très intéressantes parce qu'elles nous montrent un exemple de racines inutiles » (HOVELACQUE, *loc. cit.*, p. 597).

L'Orobanche du Lierre, avec ses racines ne dépassant pas 2 cm et sans

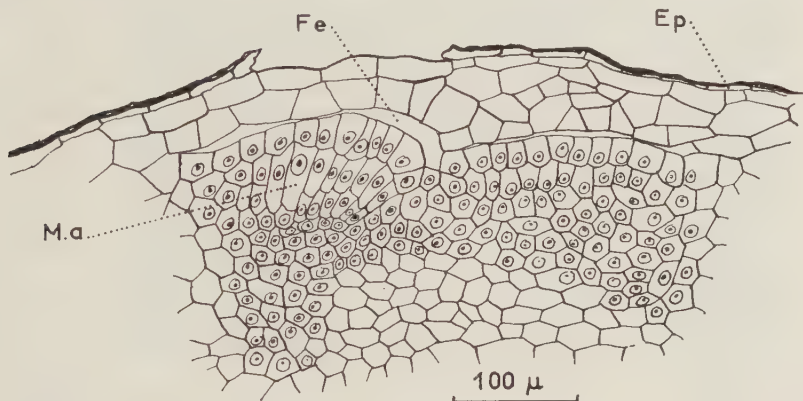


FIG. 37. — Coupe effectuée dans le méristème apical (*M. a.*) de la future hampe florale. La division des cellules sous-jacentes a déterminé une fente (*Fe*) sous l'épiderme (*Ep.*).

relation secondaire avec les tissus de l'hôte, est donc à rapprocher, sur ce point, de l'Orobanche du Genêt.

B. Origine et développement de la hampe florale. — Presque en même temps que des racines se différencient à la base du tubercule, près du sommet de l'Orobanche s'organise un bourgeon d'où sortira la hampe florale.

On voit apparaître, sous les deux ou trois assises sous-épidermiques, une série de cellules à cytoplasme plus dense que les autres et pourvues d'un noyau volumineux. Ces cellules se divisent dans le sens radial et s'allongent. Bientôt se produit un décollement entre les cellules méristématiques et les couches épidermiques situées au-dessus (fig. 37) ; une fente s'établit, isolant en quelque sorte le bourgeon.

Cette structure a d'ailleurs été fort bien vue par KOCH (1887) et par HOVELACQUE (1888) dans *O. crenata* où la hampe florale se développe à l'origine sous un véritable dôme, dont la partie supérieure forme une sorte de coiffe qui est finalement rompue sous la poussée de méristèmes.

La formation de ce bourgeon endogène est très parallèle à celle que l'on

rencontre dans les cultures de tissus végétaux, où l'on remarque, à l'intérieur du parenchyme de la culture, « des massifs de très petites cellules faiblement vacuolisées qui s'organisent en bourgeons » (GAUTHERET, 1959, p. 390).

Là aussi, dans beaucoup de cas, ces bourgeons se forment près de la surface des explantats dans un tissu parenchymateux homogène à l'origine (CAMUS, 1949).

Il est très curieux de constater qu'en de nombreux points le jeune tubercule de l'Orobanche s'apparente d'une façon étroite à une culture de tissus végétaux : possibilité de redonner à partir d'un méristème indifférencié (le procaulome) une plante entière, formation endogène du bourgeon, vascularisation ligneuse formée de trachéides réticulées.

Est-ce le caractère essentiellement hétérotrophe de ces ensembles cellulaires qui produit une telle convergence ?

De part et d'autre du bourgeon du parasite, on voit deux longues files de cellules à noyaux volumineux orientées vers le centre du tubercule et raccordées aux formations vasculaires déjà existantes.

Ces cellules se différencient plus tard en xylème et phloème pour donner naissance à la vascularisation de la future tige (fig. 25 et 30).

BLANCHARD, en 1952, observait, sur un pied de fève parasité, la présence de deux bourgeons terminaux. Pour cet auteur, ces bourgeons avaient « pour origine la germination de deux graines d'*O. speciosa* voisines sur la racine » (*loc. cit.*, p. 15).

Mais, très fréquemment, l'Orobanche du Lierre produit à partir d'un même tubercule, donc d'une même graine, plusieurs bourgeons endogènes identiques, donnant naissance à un ensemble de hampes florales.

3° L'appareil végétatif aérien. —

Nous avons jusqu'à présent entrepris l'étude des jeunes Orobanches et observé le développement des racines et la formation du bourgeon donnant naissance à la hampe florale.

Cette hampe florale va se développer d'abord assez lentement, puis, dès son apparition au niveau du sol, en quelques semaines à peine, elle va fleurir et presque aussitôt brunir, se dessécher et mourir.

L'Orobanche présente d'abord, à son point d'attache sur le Lierre, une

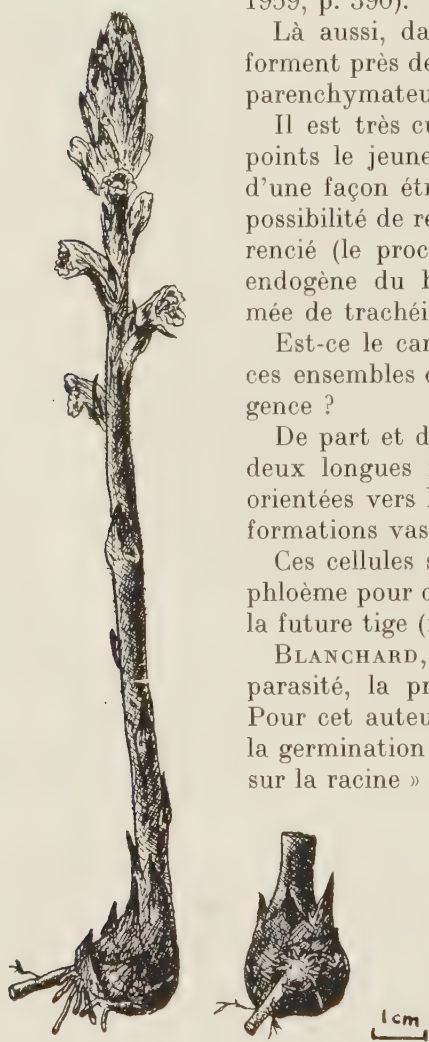


FIG. 38. — *Orobanche Hederæ*, partie basale de la hampe florale renflée en forme de bulbe. Un petit nombre de courtes racines non fonctionnelles se trouve à la base du bulbe.

base volumineuse et renflée en forme de bulbe et complètement entourée d'écaillés (fig. 38). Parmi les Orobanches qu'il nous a été donné de rencontrer, seule l'Orobanche du Genêt (*O. Rapum*) possède une base aussi volumineuse.

L'axe qui fait suite à cette partie bulbeuse est assez fin ; son diamètre dépasse rarement 1,5 cm et peut s'élever jusqu'à près de 60 cm.

Jusqu'à la première moitié de sa hauteur, on observe des feuilles écail-

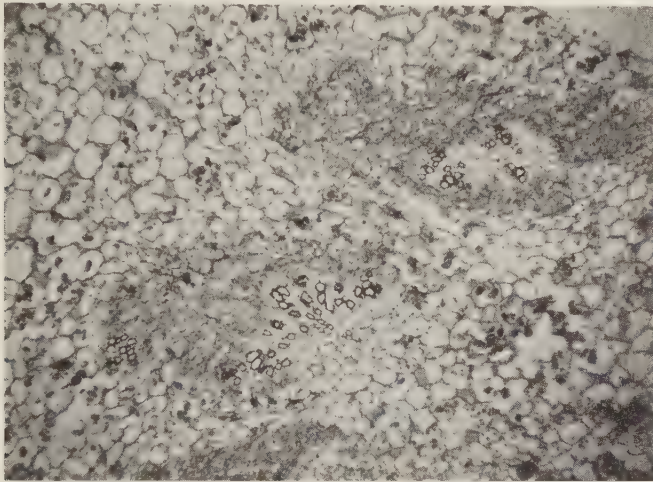


FIG. 39. — Coupe effectuée dans la partie basale de la hampe florale d'*O. Hederæ*. Ilots vasculaires en forme d'arc et presque essentiellement formés de liber. Les éléments du bois sont peu abondants. (G. $\times$ 45.)

leuses étroitement appliquées et dans la moitié supérieure, un épi de fleurs de plus en plus denses à mesure que l'on s'approche du sommet.

Suivant le but fixé au début de cette étude, nous ne nous attarderons que sur certains points qui nous paraissent utiles à préciser.

A. Partie basale de la hampe florale. — Au point de vue anatomique, l'épiderme est, comme dans les parties souterraines, formé de fines cellules en partie subérisées et exfoliées. Le parenchyme cortical est peu différencié du parenchyme médullaire ; tous deux sont formés de cellules parenchymateuses hypertrophiées bourrées de volumineux grains d'amidon (fig. 48), ce qui fait, par endroits, ressembler ces tissus à celui d'un tubercule de pomme de terre.

Le système vasculaire, dans la partie la plus basse, est très irrégulier et difficile à déterminer par l'enchevêtrement des systèmes conducteurs reliant les diverses racines entre elles.

Légèrement plus haut, hors de la limite des points de sortie des racines, les vaisseaux libéro-ligneux s'organisent dans un cercle unique, mais assez fragmenté.

Chaque îlot vasculaire prend la forme d'un arc ou même d'un fer à

cheval dont les pointes dirigées vers le centre se rejoignent quelquefois par leurs extrémités (fig. 39).

Les vaisseaux du bois, essentiellement formés de courtes trachéides réticulées, sont situés au centre même de chaque arc et en très petit nombre (fig. 39).

La majeure partie de ces ilots est presque essentiellement formée de liber constitué par de petites cellules allongées dans le sens de l'axe et

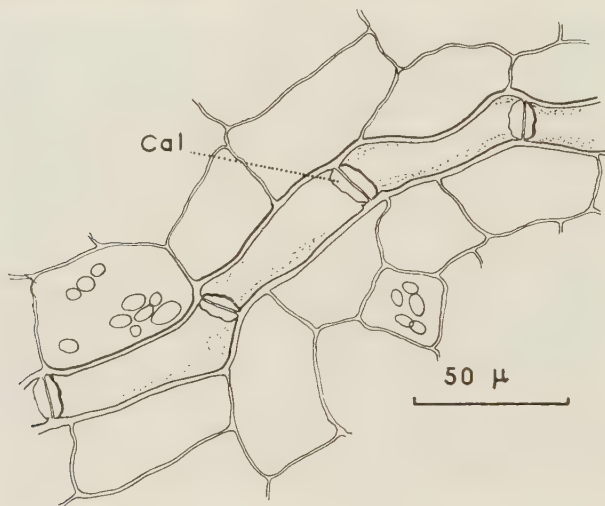


FIG. 40. — Partie basale de la hampe florale d'*O. Hederæ*. Tubes libériens avec cals très épais.

superposées les unes aux autres. Ce liber se distingue nettement du parenchyme voisin par la taille de ses cellules et par l'absence d'amidon (fig. 39).

L'existence même de vrais tubes criblés ne semble pas être fréquente chez les plantes parasites.

FRAYSSE, dans son étude anatomique de *Cytinus Hypocystis* L. notait : « Le liber séparé du bois par la zone génératrice ne mérite ce nom que par sa physionomie générale et sa position. Nulle part je n'ai pu révéler l'existence de vrais tubes criblés avec leurs cellules compagnes... C'est un liber très spécial comparable à celui des suçoirs d'*Osyris* et de *Lathræa* » (*loc. cit.*, p. 142).

CHEMIN affirmait d'ailleurs, en 1920 : « Il n'y a pas de tubes criblés dans *Lathræa squamaria* » (*loc. cit.*, p. 246).

Or, si l'on examine la partie basale d'une tige d'Orobanche du Lierre en fin d'évolution, on voit très nettement et en quantité assez considérable d'ailleurs des tubes libériens criblés, absolument identiques à ceux d'une plante autotrophe, présentant des cals très épais et fortement colorables par le bleu-coton (fig. 40).

Cette observation avait d'ailleurs déjà été faite par TATE sur les tissus de la même espèce, mais, à notre connaissance, nous ne l'avons jamais trouvée signalée dans aucune autre Orobanche.

B. La hampe florale. — Une coupe transversale effectuée dans la partie moyenne de la tige présente un certain nombre de différences avec la structure de la partie souterraine.

L'épiderme ne s'exfolie pas. Il est constitué par une assise de petites cellules presque isodiamétriques dont la membrane supérieure est légèrement cutinisée.

De place en place, on rencontre un certain nombre de poils glanduleux dont la base se compose de deux à quatre éléments cylindriques et la tête de plusieurs cellules réunies en une sorte de disque circulaire (fig. 41).

La présence de stomates sur cette tige nous paraît intéressante à signaler.

Les premiers auteurs avaient posé comme règle générale que les vrais parasites étaient constamment dépourvus de stomates.

VAUCHER lui-même était catégorique sur ce point.

DUCHARTRE fut le premier, en 1845, à observer sur la tige d'*O. Eryngii*, des « stomates formés comme d'ordinaire de deux cellules courbées en rein ; mais ces cellules présentent une particularité remarquable : elles renferment des grains de fécule bien caractérisés » (*loc. cit.*, p. 76).

HOVELACQUE indiquait, en 1877 : « Les stomates de la tige d'*O. minor* sont très saillants, les cellules stomatiques qui limitent l'ostiole sont extrêmement volumineuses » (*loc. cit.*, p. 573).

Mais, par la suite, SOLMS-LAUBACH ne voit dans les tiges d'*Orobanch*e qu'un épiderme à petites cellules dénué de stomates, et ni TATE ni KADRY, dans leurs études sur les tiges d'*O. Hederæ* et d'*O. crenata*, n'en font mention.

Or, il existe des stomates sur l'épiderme de la tige d'*Orobanch*e du Lierre, très caractéristiques d'ailleurs et assez particuliers.

Ils sont saillants et surélevés sur une colonne cylindrique de près de 100 μ de haut ; la chambre sous-stomatique est tubulaire (fig. 42).

Les cellules stomatiques assez volumineuses contiennent, comme l'avait bien observé DUCHARTRE, une quantité considérable de grains d'amidon de 4 à 8 μ de diamètre, serrés les uns contre les autres.

Quant au système libéro-ligneux, il forme ici une couronne discontinue séparant la zone corticale de la moelle (fig. 43).

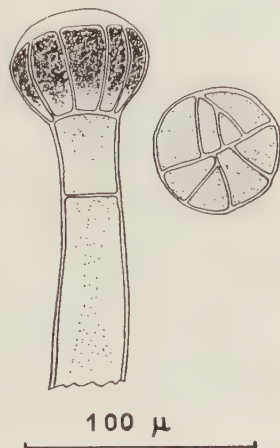


FIG. 41. — Tige d'*O. Hederæ*.
Poil glanduleux.



FIG. 42. — Tige d'*O. Hederæ*. Stomates saillants dont les cellules stomatiques sont remplies de grains d'amidon. (6 $\times$ 120.)

Dans les éléments libériens, on remarque les parois légèrement épaissies et brillantes des tubes criblés. La zone cambiale est peu développée. Les

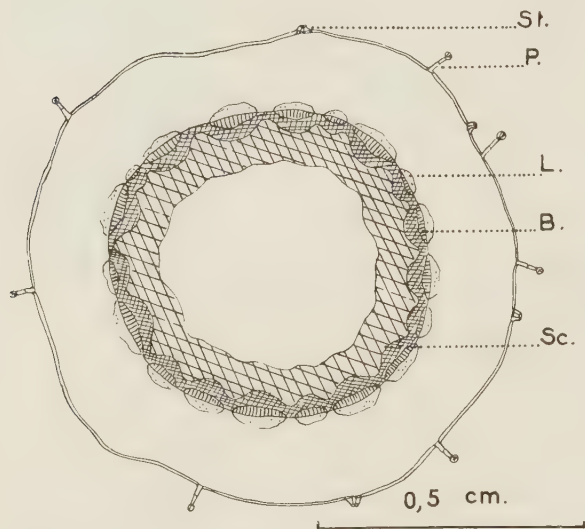


FIG. 43. — Coupe effectuée dans une tige d'*O. Hederæ*.

St. : stomate ; P. : poils glanduleux ; L. : liber ; B. : bois ; Sc. : cellules scléreuses.

insensiblement des cellules lignifiées périphériques aux cellules parenchymateuses de la moelle centrale.

Les cellules pérимédullaires, au contact du bois, prennent l'aspect de fibres effilées aux deux extrémités. Leur largeur varie de 20 à 50 μ et leur longueur peut atteindre 400 à 650 μ .

Leurs membranes présentent des punctuations en forme de fentes



FIG. 44. — Cellule scléreuse de la périphérie de la moelle dans une tige d'*O. Hederæ*. Membranes perforées de punctuations croisées.

parallèles ou le plus souvent croisées en X. Cet aspect est certainement dû à la réunion de deux punctuations elliptiques placées de chaque côté de la paroi (fig. 44).

Cette sclérification d'une partie de la moelle ne doit pas être générale chez les Orobanches, puis que KADRY et TEWFIC (1956 *b*) font remarquer l'absence de fibres et de sclérenchyme dans la tige d'*O. crenata* (*loc. cit.*, p. 397).

éléments du bois sont formés ici aussi de trachéides réticulées, mais, au fur et à mesure que l'on s'élève vers le sommet de la hampe florale, celles-ci font place peu à peu à des vaisseaux annelés et spiralés.

La partie périphérique de la moelle est presque complètement sclérifiée et forme une gainelignifiée entourant et pénétrant même le bois. Les cellules médullaires augmentent de diamètre et leurs membranes diminuent d'épaisseur à mesure que l'on approche du centre. On passe ainsi

Le centre de la tige est parfois creux et on y rencontre assez souvent, en fin de végétation, des galeries creusées par des larves de Coléoptères du genre *Elateridæ*.

C. Les écailles. — Les écailles, en elles-mêmes, n'offrent aucun élément nouveau.

Largement insérées par leur base, leur forme est triangulaire. Les nervures parallèles, en nombre variable, ne s'anastomosent pas entre elles.

Le mésophylle est composé d'une masse homogène, dense, de cellules sphériques. Sur l'épiderme se trouvent des poils capités identiques à ceux de la tige et des stomates moins proéminents.

Un seul point nous semble important, et qui, à notre connaissance, a rarement été signalé, est la présence de bourgeons à l'aisselle des écailles de la partie inférieure de la hampe florale. Ces formations ne sont pas, comme on pourrait le penser, des fleurs avortées, mais de véritables bourgeons susceptibles de former d'autres tiges florifères.

L'examen anatomique d'un de ces organes montre nettement un axe rudimentaire surmonté d'un certain nombre d'ébauches florales entourées d'écailles (fig. 45). Comme nous le verrons par la suite, ces bourgeons sont susceptibles, dans certaines conditions, de se développer et de déterminer la formation de nouveaux rejets dans la partie basale ou des ramifications sur le corps même de la tige de l'Orobanche du Lierre.

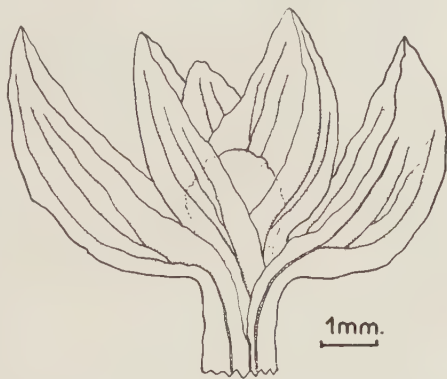


FIG. 45. — Bourgeon situé à l'aisselle des écailles se trouvant à la base de la tige d'*O. Hederæ* et montrant l'ébauche d'une hampe florale.



FIG. 46. — Coupe d'un ovaire d'*O. Hederæ*, montrant les deux carpelles avec chacun de deux placentas.

D. Les fleurs. — Dans le développement de la hampe florale, les bractées apparaissent les premières et, par leur croissance très rapide, recouvrent complètement le sommet végétatif de l'Orobanche.

À l'aisselle de ces bractées, se forment des fleurs sessiles.

Le calice est composé de deux sépales lancéolés situés de chaque côté de la fleur.

Les sépales d'une même hampe florale peuvent être en partie entiers, en partie bifides. On ne peut donc conférer de caractère spécifique à l'une ou l'autre forme.

La corolle tubuleuse et bilabée est formée de cinq pétales blancs, veinés de rouge et de violet à la lèvre supérieure.

A l'intérieur, et au niveau du premier tiers inférieur des pétales, se trouvent quatre étamines didynames, les deux antérieures étant plus développées.

L'ovaire bicarpellé est uniloculaire et montre quatre placentas pariétaux. Il est surmonté d'un long style fortement recourbé à son extrémité. Le style est terminé par un stigmate glanduleux et bilobé de couleur blanc jaunâtre.

Chaque placenta porte de nombreux ovules anatropes (fig. 46).

Le fruit est une capsule ovoïde.

En effectuant des coupes sériées dans de jeunes fleurs, on remarque que la maturité des étamines précède celles des carpelles.

Les fleurs étant protandres, la fécondation croisée semblerait être la règle.

Néanmoins, les anthères se trouvant très souvent accolées au stigmate, nous pensons, avec TIAGI (1952), que l'autopollinisation ne serait pas impossible.

4° Le cycle végétatif de l'Orobanche du Lierre. — Les expériences de germination *in vitro* nous avaient permis de remarquer la lenteur très considérable avec laquelle s'effectuent les premiers stades du développement de l'Orobanche du Lierre, puisqu'il faut près de trois mois à une graine fixée sur la racine-hôte pour former un tubercule d'une épaisseur de 2 mm à peine.

Des observations semblables peuvent d'ailleurs être effectuées dans la nature, où, pendant tout l'hiver, on ne rencontre dans le sol que des tubercules de taille assez réduite (3 à 10 mm), attachés aux racines de Lierre.

Pendant cette période, *O. Hederæ* montre donc une phase de dormance.

C'est au début du mois de mai que l'Orobanche apparaît à l'air libre. A ce moment-là, son développement est au contraire excessivement rapide. Nous avons effectué un grand nombre de mesures quotidiennes pour suivre cette évolution. La hampe florale s'accroît en moyenne de près de 1,5 cm par jour. Une semaine après son apparition en surface, un quart des fleurs de la hampe florale sont épanouies et, un mois plus tard, des graines sont déjà mûres dans les capsules situées dans la partie inférieure de cette hampe.

L'Orobanche du Lierre passe au moins un an sous terre avant de fleurir.

L'évolution de cette espèce est donc relativement très longue et présente deux phases : une phase hypogée et une phase épigée. La durée de la phase hypogée est au moins de un an et celle de la phase épigée de quelques semaines à peine, au bout desquelles la plante fleurit, se flétrit, noircit rapidement et meurt.

La durée de ce cycle végétatif n'est certainement pas la même pour toutes les espèces.

A notre connaissance, BLANCHARD a été le seul à suivre, d'une façon très minutieuse, l'évolution en plein champ d'une autre espèce, l'Orobanche de la Fève (*O. speciosa*).

Il semait des graines d'Orobanche fin novembre en même temps que des Fèves ; trente jours après, certaines graines se trouvaient déjà au stade de fixation. Après soixante jours, il notait le développement de « pseudo-racines » et de bourgeons terminaux bien développés, puis, au cent dix-huitième jour la formation de jeunes tiges écailleuses, qui atteignaient 10 cm de haut environ après cent cinquante-trois jours.

Ainsi donc certaines espèces d'Orobanche ont, au contraire, un développement assez rapide, puisque quatre mois s'écoulent à peine avant de voir apparaître le parasite hors du sol.

Les seules observations que nous possédons maintenant à ce sujet, concernent deux espèces d'Orobanche : l'une *O. speciosa*, hôte d'une plante annuelle, la Fève, et l'autre *O. Hederæ*, parasitant une plante vivace, le Lierre.

Il est évident que la végétation d'un parasite, fixé sur une plante annuelle, ne peut être que rapide.

Il serait certainement très intéressant de faire cette étude sur une autre Orobanche pouvant parasiter plusieurs espèces tant annuelles, bisannuelles que vivaces, afin de voir dans quelle mesure le cycle végétatif d'une plante parasite dépend de son hôte.

5° L'Orobanche du Lierre, plante vivace. — Le développement de l'Orobanche du Lierre est donc très lent, puisque plus d'une année se passe entre la germination de la graine et le dépérissement de la hampe florale.

VAUCHER, dès 1827, posait déjà la question : « Les Orobanches sont-elles annuelles ou vivaces ? D'abord, toutes celles qui viennent sur les plantes annuelles comme le chanvre ou la fève, sont annuelles ; non pas peut-être de leur nature, mais parce qu'elles ne peuvent se conserver sur des végétaux qui périssent... Sur les plantes vivaces, tous les bulbes persistent, non pas à la vérité en redonnant de nouveaux jets du même point, mais en repoussant des bulbes latéralement qui jettent de nouvelles racines autour d'eux » (*loc. cit.*, p. 13). « Ce phénomène se perpétue d'année en année et explique pourquoi on trouve toujours les mêmes Orobanches dans les mêmes lieux (*loc. cit.*, p. 3).

Mais, par la suite, les travaux de HOVELACQUE et de TATE se rapportant à l'Orobanche du Lierre ne donnent aucune indication à ce sujet.

Le fait d'observer les mêmes espèces tous les ans dans les mêmes lieux n'est pas suffisant pour affirmer leur caractère de plante vivace.

L'Orobanche du Trèfle est réellement annuelle, et on la rencontre pourtant chaque année dans les mêmes endroits.

Nous avons procédé, depuis longtemps déjà, à l'examen d'un nombre

considérable d'Orobanches au niveau des racines du Lierre. Le plus souvent, on aperçoit de jeunes tubercules fixés sur des radicelles avoisinant de vieux bulbes desséchés, mais non directement fixés sur ceux-ci. Quelquefois, une hampe florale est presque en fin de végétation, alors qu'à la base de sa partie souterraine renflée sortent à peine de nouveaux bourgeons adventifs.

Dans la majorité des cas observés, l'Orobanche du Lierre n'est pas une plante vivace.

Il nous a cependant été donné de faire des observations intéressantes au début du printemps, sur la base de tubercules complètement desséchés dont la hampe florale avait été détruite l'hiver précédent.

De ces parties renflées, hautes de 2 à 3 cm, une couronne de bourgeons de teinte claire, entourant un bourgeon central plus développé ressortait entre les écailles toutes noires. Dès le début de l'été, un fascicule dense de hampes florales apparaissait à la surface du sol.

Après la mort de la tige d'Orobanche, il existe donc, dans le cœur même de la partie renflée du tubercule, certaines cellules qui conservent leur vitalité et leur possibilité de division. Et, comme nous l'avons déjà remarqué, les ébauches des bourgeons se trouvant à l'aisselle de chaque écaille peuvent, sous certaines conditions encore indéterminées, se développer et produire de nouvelles hampes.

Dans certains cas, assez rares toutefois, l'Orobanche du Lierre est bien vivace et peut redonner, à partir d'un vieux tubercule, de nouveaux rejets l'année suivante.

Nous n'avons fait jusqu'à présent aucune autre observation nous permettant de déterminer si un même individu peut ainsi se perpétuer d'année en année ou si ce phénomène ne peut se réaliser qu'une seule fois.

6° L'Orobanche du Lierre, plante rameuse. — Chez les Orobanchacées, les genres *Phelypæa* et *Orobanche* se différencient surtout par la présence de trois bractées à la base des fleurs dans le premier genre et une seule dans le second.

Un autre élément peut aussi les caractériser : les tiges des *Phelypæa* sont souvent ramifiées, celles des *Orobanche* sont toujours simples.

Or, parmi le nombre très important d'Orobanche du Lierre examiné au cours de notre étude, nous avons rencontré deux individus sur lesquels un rameau latéral s'était développé à l'aisselle d'une écaille située dans le premier quart inférieur de la hampe florale (fig. 47).

Nulle part ailleurs nous n'avons trouvé signalé une semblable formation.

On pouvait penser qu'une lésion accidentelle aurait pu, en mutilant quelques bourgeons supérieurs, induire le développement d'une tige florifère à partir d'un bourgeon de la base.

Dans ce but nous avons sectionné soit un certain nombre de bourgeons sur la hampe florale, soit même le méristème apical de la tige, pensant ainsi stimuler le développement des bourgeons basilaires. Mais dans

aucun cas nous n'avons pu reproduire expérimentalement ce phénomène.

Aucune condition morphologique et écologique ne paraissent d'ailleurs nécessaires pour déterminer un tel développement : les exemplaires ainsi trouvés avaient un aspect normal, une taille plutôt réduite (20 et 27 cm), et avaient été récoltés au milieu d'un nombre important d'Orobanche du Lierre à tige non rameuse.

Les bourgeons situés à l'aisselle des écailles de la base de l'Orobanche du Lierre peuvent donc, sous l'influence d'une stimulation encore inconnue, sortir de leur dormance et se développer en tiges florifères.

Ces tiges peuvent se développer dans deux cas différents : soit à partir de la tige principale elle-même et former, comme nous venons de le voir, des ramifications secondaires ; soit à partir de vieux tubercules dont la hampe a été détruite l'année précédente et former de nouveaux rejets, rendant ainsi la plante vivace.

7^o Interprétation du stade germinal de l'Orobanche. — Dans la graine d'*Orobanché Hederæ*, le corps embryonnaire est réduit à une dizaine de cellules absolument indifférenciées.

Au moment de la germination, il développe un filament fin et délicat de 2 à 4 mm de longueur dont l'extrémité se renfle en une masse opaque et dense. Là, se concentre toute l'activité morphogénétique de la future Orobanche, le reste du filament se nécrosant.

La masse cellulaire précitée ne s'organise qu'après sa pénétration dans les tissus du Lierre.

Comment peut-on interpréter une germination aussi singulière ?

On peut formuler à ce sujet plusieurs hypothèses :

1^o On pourrait d'abord concevoir que l'embryogenèse se déroulerait en deux phases :

Une première phase de simple développement, consisterait en la formation du pro-embryon (au sens de SOUÈGES et de CRÉTÉ) et son développement ultérieur aboutirait au filament germinal parenchymateux renflé à son extrémité.

La deuxième phase débiterait, après la pénétration du renflement dans la racine-hôte, par la différenciation des organes



FIG. 47. — Un individu d'*O. Hederæ* sur lequel s'est développé un rameau latéral à partir d'un bourgeon situé à l'aisselle d'une écaille.

végétatifs de la future Orobanche (suçoir, axe, feuilles) ; elle serait la simple continuation de l'embryogenèse.

Cette hypothèse suppose qu'un ou plusieurs facteurs, nécessaires à l'organisation complète de l'embryon, manquent à la graine et que ce complément doit être recherché à l'extérieur, en l'espèce le Lierre, d'où la formation du filament germinatif.

2° Le filament germinatif et la « tumeur » qu'il forme avant de donner naissance à un nouvel individu serait un organe spécial, le *procaulome*, qui, d'après la définition qu'en donne VELENOVSKY, est « un organe filamenteux multicellulaire, sans aucun caractère de racine, d'axe, d'hypocotyle ou de cotylédons » (*loc. cit.*, 1905, p. 352).

3° On pourrait aussi penser que l'embryon étant celui d'une plante parasite, serait complet, mais simplifié et indifférencié du fait de la vie hétérotrophe.

A la germination sortirait un organisme uniformément parenchymateux, mais qui serait composé, théoriquement, de tous les organes de l'embryon normal.

Les cotylédons serviraient de suçoirs, inclus dans la graine, et, en raison de la vie hétérotrophe, seraient unis en un corps homogène, c'est-à-dire sans aucune différenciation anatomique.

Entre les cotylédons et la radicule, il y aurait l'hypocotyle. La masse terminale, au sein de laquelle se développe ultérieurement la future Orobanche, serait l'homologue de la radicule et peut-être de la portion inférieure de l'hypocotyle ; tout le reste, c'est-à-dire ce qui correspond aux cotylédons et à la plus grande partie de l'hypocotyle, se dessècherait et mourrait.

Cette interprétation est à rapprocher de ce que nous savons déjà de la germination des Gesnériacées, famille très proche des Orobanchacées.

Quelle hypothèse peut-on adopter ?

Si nous admettons que l'embryogenèse se déroule en deux phases, cette hypothèse serait acceptable à condition que les différentes parties de ce germe participent, dès la pénétration de la racine-hôte, à l'organisation de la future Orobanche, comme cela se passe dans toute plante normale et notamment chez les Gesnériacées voisines.

Or, ici, ce n'est pas le cas : l'ensemble cellulaire engagé dans la graine et la partie allongée lui faisant suite avant l'extrémité renflée se nécrosent et ne jouent aucun rôle. Il n'y a pas non plus la moindre trace d'organisation quelconque avant la « germination » sur l'hôte, du tubercule procaulomien.

Ce que l'on peut toutefois considérer comme vraisemblable dans cette hypothèse, est la nécessité, pour le germe de l'Orobanche, de trouver dans le milieu extérieur un ou plusieurs facteurs lui faisant défaut pour se développer.

On peut d'ailleurs comparer étroitement l'extrémité du germe de l'Orobanche, par sa forme tuberculeuse, par sa masse parenchymateuse et, ultérieurement, par la formation de trachéides et l'organisation de bour-

geons endogènes, à une culture de tissus végétaux. Ces tissus, tout comme l'Orobanche, possèdent la possibilité de former des bourgeons grâce à certaines substances nécessaires, ainsi que l'ont montré plusieurs auteurs.

Les expériences de M^{me} Durand-Rivières sont aussi très suggestives : si l'on cultive, en effet, des racines de jeunes sporophytes de fougères dans un milieu approprié, dans des conditions hétérotrophes, il se forme, à l'apex, un tubercule semblable à celui des Orobanches. Celui-ci est, comme celui des Orobanches, totalement indifférencié, protégé par des tissus nécrosés ; le reste de la racine meurt, comme disparaît le filament germinatif de l'Orobanche.

Dans ce tubercule se forme ensuite un foyer histogène qui aboutit à un nouveau sporophyte normal, pourvu de tous les organes.

Étant donné ces faits et connaissant l'influence profonde qu'a, sur la structure, la vie hétérotrophe, nous pouvons penser que le procaulome des Orobanches pourrait être assimilé à un pro-embryon qui aurait proliféré, sans se différencier davantage, comme une culture de tissus végétaux.

A l'extrémité qui, topographiquement, correspondrait à la racicule et, peut-être, à la partie inférieure de l'hypocotyle se formerait un foyer morphogène qui donnerait la nouvelle plante.

Ce pro-embryon particulier tiendrait ses qualités de sa vie nécessairement hétérotrophe et ne pourrait se développer en un nouvel individu que s'il trouvait dans le milieu extérieur, en l'espèce la racine-hôte, les facteurs nécessaires pour stimuler sa formation.

CHAPITRE II

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE L'OROBANCHE DU LIERRE

Historique.

Les travaux sur le chimisme des phanérogames parasites sont beaucoup moins nombreux que ceux qui ont eu pour objet leur structure ou leur développement.

Les études comparées sur les parasites et leurs plantes nourricières sont bien rares et leurs résultats isolés.

Ces questions sont cependant d'une haute importance et posent de multiples problèmes.

La chlorophylle fait défaut. Toute photosynthèse est rendue impossible. Le parasite est donc obligé de s'adresser à d'autres sources alimentaires. Il les trouve dans les organes des plantes sur lesquelles il vit et absorbe sa nourriture par des organes spéciaux, les suçoirs.

Quelles sont les substances absorbées ? Y a-t-il un chimisme particulier au parasite ou bien les deux organismes si intimement unis ne participent-ils pas, dans une certaine mesure, aux mêmes synthèses ?

Le mécanisme de la nutrition de ces plantes était considéré, à l'origine, comme le fait d'un prélèvement massif, par les organes de fixation du parasite, de la sève complètement élaborée par l'hôte.

CHATIN, en 1891, commença à ébranler cette conception en montrant que, bien souvent, certaines substances existant dans l'hôte au voisinage immédiat du point d'implantation du parasite ne se rencontraient pas dans ce dernier.

Un peu plus tard, MIRANDE (1901), dans son étude sur l'anatomie et la physiologie des Cuscutées, fut le premier à essayer de découvrir la nature des produits que ces végétaux, privés de la faculté d'assimiler directement le carbone, empruntent à leur hôte.

Par la suite, FRAYSSE, en 1906, sur *Cytinus*, et CHEMIN, en 1920, sur *Lathræa*, précisent le rôle prépondérant du glucose et de l'amidon dans la nutrition de ces espèces sans chlorophylle.

Mais, sur les Orobanches elles-mêmes, les recherches biochimiques sont peu nombreuses et souvent dispersées.

LORY (1847) semble être le premier à avoir abordé ce problème en suivant la localisation de l'amidon dans les divers tissus de certaines espèces.

En 1907, MIRANDE indique l'absence totale dans les Orobanches de

nitrate, que LUTZ, un an plus tard, dose, par contre, en quantité importante.

CHARAUX, en 1910, caractérise, sans l'isoler, l'acide chlorogénique dans *O. Rapum*, *O. Epithymum* et divers *Phelypæa*, et, en 1924, avec BRIDEL, il extrait de tubercules d'*O. Rapum*, un hétéroside, l'Orobanchoside.

En 1923, NICOLOFF entreprend le dosage des substances minérales (Ca, Mg et K) dans *O. ramosa* et son hôte, le Tabac.

Puis, un temps assez long s'écoule et il faut arriver en 1949 pour retrouver à nouveau une étude sur ces plantes. A cette date, HALLER analyse les membranes d'*Orobanche ramosa* et, en 1953, RUBINSSTEIN et ses collaborateurs isolent un alcaloïde d'*O. lutea*, l'Orobanhamine (1).

Le problème de la nutrition des Orobanches semblait donc à peine ébauché et il nous a paru utile d'entreprendre une étude biochimique plus approfondie d'une de ces plantes, en l'espèce l'Orobanche du Lievre.

Nos travaux ont porté surtout sur l'étude des métabolismes essentiels, glucidiques et azotés. Nous avons suivi et caractérisé les éléments existant dans le parasite et ceux existant parallèlement dans l'hôte au niveau de la zone de contact des deux partenaires afin de déterminer si la constitution biochimique de l'Orobanche et l'évolution de ces substances étaient semblables à celles d'une plante autotrophe, ou si, par contre, on pouvait mettre en évidence certaines différences dues au parasitisme.

Au préalable, nous avons voulu vérifier l'absence de chlorophylle, ce qui nous a amené à entreprendre l'étude des pigments.

Au cours de notre travail, IZARD publiait, en 1958, ses recherches biochimiques sur les graines de l'Orobanche du Tabac (*Phelypæa ramosa*). Il caractérisait dans ces graines la présence de huit acides aminés et de trois sucres et suivait leurs variations durant la période prégerminative.

Une note très intéressante d'ANSIAUX (1958) paraissait sur l'important problème de la pénétration des substances minérales dans ces parasites. N'ayant pas entrepris d'étude en ce sens, nous avons néanmoins consacré un court paragraphe à l'examen des arguments apportés à l'appui de cette hypothèse.

Les pigments.

Les *Orobanche* sont depuis longtemps considérées par la plupart des auteurs comme des plantes « totalement parasites, dépourvues de chlorophylle et, partant, incapables d'assimiler » (GUILLIERMOND, 1933, p. 142).

Il semble toutefois que cette opinion ne soit pas partagée par tous.

MARCHAL, en 1950, dans ses *Éléments de Physiologie végétale*, écrivait en effet : « Le parasitisme est *presque total* chez les plantes à appareil chlorophyllien très réduit, à tige brun-rouge, couvertes d'écailles, qui végètent sur les racines (Orobanches) et sur les tiges (Cuscutées) de leur

(1) Nous n'avons pu vérifier, sur la publication originale de RUBINSSTEIN, l'orthographe exacte de ce terme. L'extrait des *Chemical abstracts* porte, à plusieurs reprises, « orobanhamine ».

hôte. Il est *intégral* chez les plantes sans chlorophylle, qui croissent directement sur des sols riches en humus (*Monotropa*, *Neottia*) ou qui enfoncent leur suçoir dans les racines de l'hôte (Balanophoracées, Rafflesiacées) » (*loc. cit.*, p. 152).

Le doute qui planait donc sur cette question nous a incité à effectuer des recherches biochimiques en ce sens.

1° Recherche et extraction du complexe total chlorophyllien. —

PRINCIPE. — Les pigments sont extraits par des solvants organiques et chromatographiés sur colonne adsorbante suivant la technique de WINTERSTEIN et STEIN (1931).

TECHNIQUE. — Cent grammes d'*Orobanché Hederæ* (plante entière en pleine végétation au mois de juin) sont, immédiatement après la récolte, broyés à basse température et extraits par un mélange de solvant de composition suivante : éther de pétrole : 675 ml ; benzène : 75 ml ; méthanol : 240 ml. L'addition de solvant est répétée par fraction jusqu'à obtention d'un liquide extractif incolore, ce qui nécessite, en volume, environ dix fois le poids de la plante mise en œuvre.

La solution obtenue est transvasée sur un filtre de Buchner monté sur une fiole à vide. La phase aqueuse est décantée et éliminée. La phase organique est passée en exerçant une très légère aspiration sur une colonne de DHERE à trois adsorbants.

A la partie inférieure du tube, on dispose une couche d'alumine, puis une couche moyenne de carbonate de calcium et enfin de saccharose, finement pulvérisé et tassé d'une façon homogène. Les pigments sont retenus en des zones différentes de la colonne.

La partie supérieure de la colonne, où normalement sont adsorbées, sur des chromatogrammes comparatifs effectués avec des extraits de feuilles de Lierre, les chlorophylles α et β , ne montre, en lumière de Wood, aucune fluorescence caractéristique de ces substances. Par contre, la base de la colonne présente, dans les couches à CO_3Ca et à alumine, des pigments caroténoïdes (xanthophylles et carotènes).

La réaction de CARR et PRICE, effectuée directement sur les extraits des solutions éthérées de ces couches, était nettement positive. Nous avons entrepris la recherche et l'extraction de ces substances.

2° Extraction et dosages des caroténoïdes. —

PRINCIPE. — Les caroténoïdes sont extraits par l'éther de pétrole après saponification de la plante par l'alcool potassique et, après caractérisation, dosés au photocolorimètre suivant la technique de BRUNEL (1952).

TECHNIQUE. — Cent grammes de plantes récoltées en plein développement au mois de juin sont broyés avec 400 ml d'éthanol à 80°, saturé de potasse. Après trente minutes d'ébullition sous reflux, les pigments sont extraits dans une ampoule à décantation par agitation de la solution

alcaline avec de l'éther de pétrole. La phase aqueuse est décantée et rejetée. La phase pétroléique est concentrée sous pression réduite, lavée à l'eau, puis déshydratée au moyen de sulfate de sodium anhydre.

Cet extrait de couleur jaune d'or présente les réactions caractéristiques des caroténoïdes : en ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, cet extrait se colore en bleu clair. La même coloration est obtenue avec une solution chloroformique de trichlorure d'antimoine (réaction de CARR et PRICE).

Cette solution pétroléique de caroténoïdes est alors dosée au photocolorimètre de Jobin et Yvon, écran 47, comparativement à une solution de bichromate de potassium à 0,025 p. 100. Cette dernière solution correspond colorimétriquement à une solution à 0,165 mg de β carotène dans 100 ml d'éther de pétrole. Pour des concentrations peu élevées, il y a proportionnalité entre les intensités de coloration des solutions de bichromate et de β carotène (cf. BRUNEL, 1952, 4, p. 63).

Nous avons effectué dans des conditions identiques les mêmes dosages sur les feuilles et les racines de l'hôte, le Lierre, et sur les fleurs, tiges et parties basales d'*Orobanche Hederae*.

Les résultats sont consignés dans le tableau VI.

TABLEAU VI. — TENEUR EN CAROTÉNOÏDES DES DIVERS ORGANES DE L'OROBANCHE ET DU LIERRE.

Organes	HÔTE : <i>Hedera Helix</i> .		PARASITE : <i>Orobanche Hederae</i> .		
	Feuilles.	Racines.	Parties basales.	Tiges et écailles.	Fleurs.
Teneur en caroténoïdes exprimée en milligrammes de β carotène, pour 100 g de plantes fraîches	29,200	0,660	0,990	0,990	1,320

Si on considère ces résultats, on remarque dans l'*Orobanche* une teneur en caroténoïdes assez faible, mais non négligeable. La concentration est presque identique dans ses divers organes, les fleurs étant toutefois légèrement plus riches en ces substances. Les plastes paraissent donc, dans les différentes parties de la plante, fonctionner d'une manière homogène, sans qu'on puisse nettement distinguer un tissu où s'effectue une synthèse plus importante qu'une autre.

Les organes que nous avons analysés chez la plante-hôte, le Lierre, possèdent par contre des proportions tout à fait normales en ces éléments (29,20 mg pour les feuilles et 0,66 pour les racines).

3^o Considérations. — SUR L'ABSENCE DE CHLOROPHYLLE. — En confirmant, par nos analyses, l'absence de chlorophylle dans les tissus de l'Orobanche étudiée, il nous est, semble-t-il, permis de revenir sur une question importante que nous avons esquissée dans un chapitre précédent.

Quelles hypothèses peut-on formuler sur l'origine de cette perte importante de synthèse ?

Peut-on continuer à penser avec R. CHODAT que la perte de chlorophylle aurait, à l'origine, précédé et induit le parasitisme ?

Nous avons déjà formulé l'opinion qu'une « greffe accidentelle initiale » aurait mis en relation, dans un temps plus ou moins éloigné, une Scrofulariacée chlorophyllienne avec une plante verte. La greffe étant réussie, la matière nutritive abondante passant de l'hôte dans les tissus du « greffon » aurait, en partie, déterminé la régression des plastes.

Cette hypothèse nous avait été suggérée par les conclusions d'EMBERGER, sur la régression des chloroplastes. Cette régression « s'opérerait dans des conditions physiologiques déterminées. L'une de ces conditions serait le mode de nutrition des cellules : lorsque la nutrition cesse d'être autotrophe, lorsque les cellules reçoivent un matériel de glucides abondant, la chlorophylle cesse d'être élaborée et les chloroplastes régresseraient à l'état de chondriosomes » (*loc. cit.* in *Traité* de GUILLIERMOND et MANGENOT, 1933, p. 518).

Nous retrouvons exactement la même idée, exprimée dans une étude récente de RABINOWITCH, dont les travaux en matière de photosynthèse font autorité : « La régression ou dégénérescence locale d'espèces photosynthétiques (comparable à l'atrophie de certains organes chez les parasites) a eu lieu quand ces espèces se sont trouvées par accident dans des endroits où leur capacité photosynthétique représentait un luxe superflu, parce qu'un mode de vie moins ardu y était possible » (*loc. cit.*, 1955, p. 30).

D'ailleurs, réciproquement, c'est une carence en glucides ou en substances nutritives qui amène chez les Cuscutées, parasites presque totalement dépourvues de chlorophylle, un verdissement de la plante (MIRANDE, 1901 ; Loo, 1945).

La perte de chlorophylle des plantes parasites ne paraît pas être primitive, comme semblait le penser R. CHODAT, mais secondaire à une greffe accidentelle initiale.

« Le chondriome des êtres achlorophylliens en général, peut être considéré comme un chondriome qui, primitivement vert, a régressé et s'est différencié sous l'influence du régime hétérotrophe » (EMBERGER, 1927, p. 33).

Nous pensons donc que c'est réellement « l'adaptation à la vie hétérotrophe, qui a amené une dégradation progressive suivie d'une disparition des chloroplastes » (EMBERGER, 1925 a, p. 227).

SUR LA PRÉSENCE DE CAROTÉNOÏDES. — La présence de caroténoïdes chez les Orobanches n'est pas une notion nouvelle. Elle avait été déjà signalée par EMBERGER : « L'étude microscopique (de ces plantes) montre que les plastes produisent surtout de l'amidon, mais encore, en certaines

parties du végétal, du carotène et de la xanthophylle » (*loc. cit.* in *Traité* de GUILLIERMOND et MANGENOT, 1933, p. 142).

Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude biochimique n'avait été entreprise sur les Orobanches pour caractériser et doser ces pigments.

Ce problème est fort important. Il pose deux questions qui ne semblent pas encore être résolues pour le moment : la formation des caroténoïdes est-elle liée à celle de la chlorophylle ?

Ces pigments jouent-ils un rôle dans les processus d'assimilation ?

Une opinion, encore répandue, ferait dériver les caroténoïdes de l'attaque de la chlorophylle par des enzymes oxydants (LUBIMENKO). GUILLIERMOND, par contre, avait déjà observé que, dans beaucoup de cas, « des caroténoïdes se formaient directement dans les leucoplastes sans qu'il y ait aucune production de chlorophylle » (*loc. cit.*, 1933, p. 539).

Nos propres résultats indiquent la présence de caroténoïdes dans une plante en l'absence même de chlorophylle. Il peut donc, d'après nous, ne pas y avoir d'origine commune entre ces deux catégories de pigments.

Dans une étude récente (1958) sur la biosynthèse des caroténoïdes, BODEA, FLORESCU et DRUGAN concluent d'ailleurs pareillement leurs résultats « en faveur de l'indépendance des synthèses caroténoïdiques et chlorophylliennes ».

Le rôle exact des caroténoïdes dans le biochimisme des plantes n'est pas encore bien élucidé.

D'après HEILBRON et COOK, « la présence universelle de caroténoïdes, seuls ou mélangés, dans les feuilles vertes, conduit à penser qu'ils jouent un rôle essentiel dans la photosynthèse. La formation facile d'époxydes par de nombreux caroténoïdes et le départ facile d'oxygène époxydique fait inévitablement penser à un mécanisme possible du transport d'oxygène » (*loc. cit.*, 1951, p. 178).

Mais l'opinion la plus commune est que ces pigments maintiennent un certain équilibre entre les deux chlorophylles α et β ; en l'absence de ces éléments, quels rôles joueraient-ils ? En l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas encore possible, semble-t-il, de répondre à cette question.

Tout ce que nous pouvons préciser, c'est que la régression des plastes sous l'influence du parasitisme semble s'effectuer progressivement. La fonction chlorophyllienne doit d'abord être la première atteinte, puis on assiste à une diminution sensible de la quantité des pigments caroténoïdiques, sans toutefois que ces derniers disparaissent, comme nos résultats le prouvent. L'amylogenèse est certainement la fonction la moins lésée, comme nous le verrons par la suite, et semble, dans le cas des Orobanches, être au contraire stimulée.

Mais ces plastes sont certainement capables aussi de réversibilité. Ce phénomène très curieux a été observé pour la première fois par EMBERGER pendant la formation des spores et des cellules sexuelles des Ptéridophytes.

Ces éléments « revenus à l'état mitochondrial, peuvent se différencier à nouveau en plastes » (*loc. cit.*, 1925 b, p. 879).

Un état physiologique particulier a dégradé les chloroplastes en leur

faisant d'abord perdre leurs pigments verts. On peut se demander si, par certaines conditions nutritives artificielles, il ne serait pas possible d'amener, en sens contraire, la « réversion » de ces plastes et ainsi faire « reverdir » les Orobanches, comme c'est le cas pour des racines d'Orge, de Lupin et de Radis cultivées par GAUTHERET dans des milieux appropriés.

Ces plantes « qui n'ont plus aucune trace de chlorophylle et n'ont que des amyloplastés, peuvent être d'ailleurs mis en parallèle, du point de vue cytologique, avec les racines de plantes vertes » (EMBERGER, 1927, p. 34).

Les essais de culture *in vitro* que nous avons par la suite effectués ont été entrepris dans ce but.

Les matières minérales.

L'Orobanche du Lierre, dont les racines ne paraissent pas fonctionnelles, est obligée de prendre à son hôte un certain nombre d'éléments et, en particulier, les matières minérales.

L'analyse de ces différents ions dans les tissus de l'hôte et de ce parasite serait certainement très intéressante à effectuer, car elle permettrait sans doute de résoudre ce problème essentiel qui est celui du lieu de passage des divers éléments nutritifs entre les deux partenaires ; mais il ne nous a pas été possible jusqu'à présent d'effectuer cette étude.

Nous ne voudrions pas néanmoins passer sous silence un travail très récent, qui a le grand mérite d'être le seul, à notre connaissance, à apporter une explication à ces phénomènes.

Dans une note à l'Académie Royale de Belgique, ANSIAUX (1958) formule l'hypothèse selon laquelle, « chez les végétaux holoparasites, le transport des ions alimentaires à partir de la plante hôte se ferait non par le bois, mais par le phloème » (*loc. cit.*, p. 787).

D'après les travaux de MUNCH (1930), la physiologie des plantes parasites pourrait, en effet, se comparer à celle des fruits où, la transpiration étant réduite, la circulation des glucides et des sels minéraux se ferait essentiellement à travers le phloème.

D'autre part, il serait démontré, depuis CURTISS et CLARK (1950), que la voie libérienne pourrait permettre le passage de tous les ions, *sauf le calcium*.

Par conséquent, « si le transport des matières minérales dans les parasites se fait de façon prépondérante en circulation libérienne, ces organismes seront nécessairement non pas dépourvus de calcium, mais relativement très pauvres en cet élément » (*loc. cit.*, p. 788).

Effectivement, d'après les résultats d'analyses effectuées par BORESCH (cf. tableau VII), les teneurs en calcium sont très faibles dans les plantes parasites. Elles n'atteignent en moyenne que 9 p. 100 alors que, dans les espèces autotrophes, ce taux dépasse le plus souvent 25 p. 100.

On peut donc très vraisemblablement penser que les substances minérales de l'hôte vers le parasite peut se faire en partie par le phloème.

TABLEAU VII. — COMPOSITION MINÉRALE DE DIVERSES PHANÉROGAMES PARASITES.
(D'après BORESCH, 1935, cité par ANSIAUX, 1958, p. 789.)

ESPÈCES.	EN mg/100 g. DE MATIÈRE SÈCHE				POURCENTAGE DE LA SOMME CATIONIQUE.		
	K	Ca	Mg	Somme	K	Ca	Mg
<i>Lathræa squamaria</i>	48,9	2,2	30,7	81,8	60	3	37
<i>Orobanche gracilis</i>	29,2	9,0	3,2	41,4	70	22	8
<i>O. Muteli</i>	54,1	8,2	1,8	64,1	84	13	3
<i>O. ramosa</i>	57,0	2,1	11,8	70,9	80	3	17
<i>Cuscuta europæa</i>	102,3	5,7	10,1	118,1	87	5	8
<i>Monotropa Hypopitys</i>	74,1	11,7	8,1	93,9	79	12	9

De plus, si nous nous en reportons aux travaux de NICOLOFF (1923), qui a analysé comparativement les substances minérales des cendres de l'Orobanche du Tabac et de son hôte, nous voyons non seulement que la quantité de calcium chez le parasite est au moins vingt fois plus petite que chez l'hôte, mais aussi que le pourcentage de potassium est, par contre, plus élevé (tableau VIII).

TABLEAU VIII. — COMPOSITION MINÉRALE D'« O. RAMOSA » ET DE SON HÔTE, LE TABAC.
(D'après NICOLOFF, p. 598.)

	DANS 100 g DE CENDRE, ON TROUVE :		
	K ₂ O	CaO	MgO
<i>O. ramosa</i>	37,2	1,4	2,0
Tabac envahi par l'Orobanche	18,2	20,4	5,11

Il est d'ailleurs curieux de constater que les résultats analytiques de HOMES (J. L. A.) (1959) sur les échanges de cations entre porte-greffe et greffon chez *Gossypium hirsutum* L. sont très superposables à ceux de l'Orobanche et de son hôte. « Le greffon diffère de la partie correspondante du témoin par une élévation de la proportion en potassium et une diminution de celle de calcium » (*loc. cit.*, p. 41). « La différence de répartition des

cations pourrait être l'indice de ce que... les substances minérales sont surtout amenées du sujet vers le greffon par voie cytoplasmique. C'est dans ces conditions qu'intervient la grande solubilité reconnue de l'ion potassium » (*loc. cit.*, p. 50).

Nous partageons d'ailleurs l'opinion d'ANSIAUX sur la possibilité des échanges cationiques entre hôte et parasite en partie hors du xylème, mais le parallélisme des résultats analytiques entre greffon et parasite nous suggère surtout l'idée d'un passage important de ces éléments par voie cytoplasmique à travers l'ensemble des tissus entre les deux partenaires.

Il serait nécessaire, nous semble-t-il, d'effectuer une analyse parallèle des éléments minéraux non seulement dans les cendres, mais aussi dans les contenus cellulaires à l'état soluble (jus de presse) du parasite aussi bien que de l'hôte au niveau même de l'haustorium.

En effet, les Orobanches ne puisent pas leurs aliments dans le sol, mais dans une plante qui déjà, elle-même, a opéré une sélection parmi ces différents éléments et qui, pour le cas du calcium, peut d'ailleurs avoir rendu ce dernier en partie insoluble sous forme d'oxalate et, partant, peu assimilable pour le parasite.

O. Hederæ ne contient pas de macles d'oxalate de calcium ; par contre, les racines de Lierre en sont très riches, plus particulièrement dans la zone corticale. Ces macles sont situées jusque dans les cellules limitrophes de l'Orobanche, sans qu'on ne distingue d'indice de solubilisation de ces sels.

Les substances glucidiques.

1° Glucide insoluble : l'amidon. — L'amidon est le composé glucidique visiblement le plus abondant dans les tissus du parasite. Son étude a été effectuée sur des coupes pratiquées dans les divers organes de la plante, aux différents stades de son développement.

A. Dans l'Orobanche. — Une fois le procaulome fixé sur la racine de Lierre et les connexions vasculaires établies entre les deux partenaires, la plupart des cellules du tubercule, autres que celles des méristèmes et des éléments conducteurs, contiennent des grains d'amidon ovalaires d'une taille de 8 à 12 μ . Cet amidon demeure ainsi identique, sans aucune variation notable, dans cet organe pendant toute la vie souterraine de la plante.

Dès le mois d'avril, le tubercule de l'Orobanche commence à développer sa hampe florale. L'amidon s'accumule dans ses différents tissus, surtout dans la partie basale. Les grains sont alors très volumineux dans les cellules hypertrophiées de la moelle et de la zone corticale. Leur forme est, en général, ovale, avec la partie la plus étroite assez souvent tronquée. Leur taille varie de 15 à 30 μ de long, sur 10 à 20 μ de large. Certains grains peuvent atteindre près de 60 μ dans leur plus grande dimension. Les stries sont très peu apparentes, et l'on observe quelquefois un hile linéaire déchiré dans la partie la plus évasée du grain. Une coupe de cet organe ressemble

d'une façon frappante à celle d'un tubercule de pomme de terre, par la forme et la densité de l'amidon (cf. fig. 48).

Avant l'épanouissement des fleurs, les divers tissus de la tige contiennent des grains moins volumineux, mais en quantité presque aussi considérable. A la floraison, l'amidon disparaît presque de cet organe et ne se localise que dans la zone corticale du liber, sous forme de grains plus petits et très allongés. La moelle n'en contient presque plus. Cet amidon s'hydrolyse certainement très vite et se repolymérise dans la fleur, surtout dans les cellules de l'ovaire au niveau des placentas où les grains sont aussi abondants que dans la partie basale. Leur forme est ronde et leur taille relativement homogène, avec une dimension moyenne de 25 μ .

Dans cet organe, les métabolismes sont certainement très importants, pour déterminer les différentes synthèses nécessaires à la formation des graines. Dans ces dernières, l'amidon se localise dans le tégument, puis dans l'albumen.

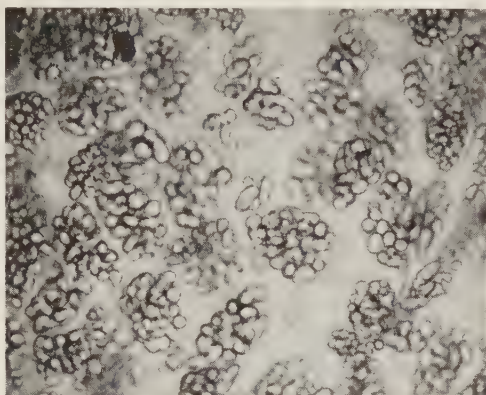


FIG. 48. — Partie basale de la hampe florale d'*O. Hederae* : cellules parenchymateuses hypertrophiées contenant une quantité très considérable d'amidon. (G. $\times$ 120.)

Au moment de la germination, les grains s'accumulent vers l'extrémité du procaulome et c'est certainement à partir de cette réserve hydrocarbonée que pourra se faire le développement du jeune tubercule de l'Orobanche avant que le contact avec la plante-hôte ne soit définitivement établi.

B. Dans le Lierre. — Normalement, une racine de Lierre non parasitée présente, dans le parenchyme cortical et dans les rayons médullaires du xylème, de nombreux grains d'amidon, ronds, très homogènes, isolés et quelquefois composés, d'une taille variant de 2 à 20 μ .

Si on examine la même racine dans la zone de contact avec l'Orobanche, pendant que le parasite progresse à l'intérieur de ses tissus, on remarque la disparition de l'amidon dans toutes les cellules soumises à la stimulation du parasite. Mais, si l'on effectue des coupes dans la région de la racine du Lierre où la progression du parasite a cessé, l'amidon est à nouveau présent, même au voisinage immédiat de l'Orobanche.

C. Conclusions. — De ces observations se dégagent les remarques suivantes :

L'abondance de l'amidon dans les tissus de l'Orobanche indique tout d'abord une activité très intense de ses plastes, qui, ayant perdu la propriété d'élaborer de la chlorophylle, ont conservé et, semble-t-il, même

développé la faculté de polymériser les sucres solubles que le parasite doit recevoir obligatoirement de la plante-hôte.

Cette forme d'accumulation d'hydrate de carbone est certainement une source énergétique très importante pour les divers métabolismes du parasite. Sa localisation dans la partie basale renflée et dans les ovaires et sa répartition suivant les diverses époques de la végétation sont identiques à celles d'une plante autotrophe.

Le problème de l'origine de cette substance peut-être déjà posé ici. Pour MIRANDE, FRAYSSE et CHEMIN, « l'amidon du parasite proviendrait exclusivement de l'amidon contenu dans l'hôte » et, après solubilisation par « des diastases exosmosées par le sucoir », se polymériserait à nouveau. « Cette action est indéniable, puisque les grains qui sont soumis à cette action disparaissent peu à peu dans la zone de contact de l'hôte » (*loc. cit.* FRAYSSE, p. 65).

Nous ne pensons pas, personnellement, que cette disparition d'amidon dans le Lierre, durant la progression du parasite, soit une preuve que des diastases seraient « exosmosées » par celui-ci dans le but « de transformer, de sélectionner et d'absorber les produits contenus dans cette zone » (*loc. cit.* MIRANDE, 1901, p. 47).

En effet, cet amidon fait défaut surtout dans la partie du Lierre soumise à la stimulation du parasite, et il est normal que ces cellules, proliférant activement, « dépensent beaucoup d'énergie, brûlent tous les sucres qu'elles contiennent et n'en condensent pas sous forme d'amidon » (EMBERGER, *in* Guillermond, 1933, p. 140).

Cette stimulation suggère, comme nous l'avons déjà vu, la diffusion par les cellules en division du parasite, de substances de croissance dans les tissus de l'hôte. Il ne serait donc pas impossible que ces substances influent aussi sur l'hydrolyse de l'amidon du Lierre, comme l'a observé J. TRONCHET (1958) sur les plantules de Cuscutes.

2° Glucides solubles. — Nous avons, dans cette étude, suivi tout d'abord l'évolution des sucres réducteurs et non réducteurs dans les divers organes de l'Orobanche et du Lierre. Puis, au moyen des techniques chromatographiques, nous avons entrepris leur caractérisation.

A. Variations des glucides solubles. — I. TECHNIQUES. — Nos analyses ont porté sur des Orobanches récoltées en plein épanouissement.

Les différentes parties du Lierre ont été prélevées dans la zone immédiate d'implantation du parasite.

Hôte et parasite, récoltés au même moment, ont été immédiatement stabilisés suivant la technique de BOURQUELOT. Les organes, préalablement pesés et grossièrement divisés, sont projetés dans de l'éthanol maintenu bouillant et d'un degré alcoolique variant suivant la teneur en eau de chaque organe. Après trois extractions successives, les différentes parties sont réunies et, après élimination de l'alcool par distillation sous pression réduite, reprises par l'eau.

Les substances réductrices autres que les sucres (acides organiques, tanins) qui peuvent fausser les dosages sont éliminées par défécation avec une quantité juste suffisante de sous-acétate de plomb. L'excès de plomb est ensuite précipité par une solution saturée de PO_4HNa_2 . Sur la liqueur filtrée, parfaitement limpide, ramenée à un volume égal au poids de la plante mis en œuvre, nous avons effectué les différents dosages suivant la méthode de G. BERTRAND.

II. RÉSULTATS. — Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau IX.

TABEAU IX. — TENEUR EN GLUCIDES SOLUBLES DES DIVERS ORGANES D' « OROBANCHE HEDERÆ » ET DE SON HÔTE, LE LIERRE.

		SUCRES RÉDUCTEURS exprimés en glucose (g/% poids frais).	SUCRES NON RÉDUCTEURS exprimés en saccharose (g/% poids frais).
<i>Orobanche Hederæ</i> D.	Racines	0,034	0,029
	Parties basales.	0,410	0,266
	Tiges	0,356	0,171
	Fleurs	1,100	0,034
	Fruits	0,132	0,124
<i>Hedera Helix</i> L.	Racines	0,648	1,295
	Tiges	0,765	0,508
	Feuilles	1,200	0,666

Les valeurs sont calculées en grammes pour 100 g de plantes fraîches, les sucres réducteurs étant exprimés en glucose, et les sucres non réducteurs en saccharose.

En ce qui concerne l'Orobanche, nous remarquons tout d'abord que les sucres réducteurs dominent dans tous ses organes. Ces glucides sont d'ailleurs facilement assimilables et pourraient représenter la principale forme d'hydrate de carbone passant directement de l'hôte dans les tissus du parasite.

Les racines semblent avoir un stock énergétique juste suffisant pour leur métabolisme propre, mais ne paraissent pas participer à l'activité générale de la plante, tout au moins à cette phase du cycle végétatif.

Dans la partie basale, les sucres solubles sont relativement peu abondants, par rapport à la grande quantité d'amidon que ces tissus contiennent. Il semble donc que les sucres solubles empruntés à l'hôte doivent se polymériser très rapidement dans cette zone.

Les valeurs trouvées dans cette partie et dans la tige ne doivent représenter que les glucides à nouveau mobilisés et émigrant vers les fleurs. C'est, en effet, dans ces organes que les concentrations sont les plus élevées,

surtout en sucres réducteurs (glucose ou fructose) qui, très certainement, vont se polymériser en amidon dans les parois de l'ovaire.

Les fruits en fin de végétation et prêts à s'ouvrir ne possèdent d'ailleurs qu'un taux assez faible d'hydrates de carbone solubles.

Enfin, la migration de ces substances se fait à l'intérieur des tissus de l'Orobanche d'une manière tout à fait comparable à celle d'une plante autotrophe pendant la même période de végétation.

Les racines du Lierre contiennent des quantités de glucides nettement plus importantes que les parties basales de l'Orobanche, qui sont pourtant intimement unies.

B. Caractérisation des glucides solubles présents dans l'hôte et dans le parasite. — I. TECHNIQUES. — Nous avons employé comme technique, pour caractériser les glucides solubles, la chromatographie de partage sur papier.

Les Orobanches ont été étudiées à deux époques différentes de leur végétation : au mois de mai et de juin, sur des individus dont les fleurs étaient à peine épanouies, et au mois de juillet, sur des plantes en plein développement portant des fruits déjà mûrs.

Le Lierre était chaque fois prélevé dans la zone de contact de l'Orobanche.

Nous sommes partis d'extraits stabilisés par la méthode de BOURQUELOT et repris par l'alcool à 50°, sans effectuer de défécation. Chaque solution est alors déminéralisée par passage successif sur des résines échangeurs d'ions.

Sur les résines cationiques (PHILLIP et PAIN, C 50 D) sont retenus les cations et les acides aminés, et sur les résines anioniques (PHILLIP et PAIN, A 300 D), les anions et les acides organiques.

Seuls, glucides et pigments ne sont pas fixés.

Cette déminéralisation ne semble pas indispensable. Les travaux récents de GALANTI prouvent d'ailleurs que, si le taux des substances minérales ne dépasse pas 10 p. 100 par rapport aux sucres totaux, la séparation des spots glucidiques est relativement satisfaisante sans désionisation. Mais, ayant entrepris parallèlement la caractérisation des acides aminés et organiques, nous avons préféré l'emploi des échangeurs d'ions, bien que cette opération soit assez longue.

Les solutions recueillies sont alors concentrées sous pression réduite, à une température inférieure à 50°, et reprises par un volume connu d'éthanol à 50°.

Les extraits à étudier sont disposés à l'aide d'une micropipette sur des feuilles de papier Arches 302. La concentration de nos extraits variant de 7 à 50 γ de sucres totaux par millimètre cube, les doses déposées ont varié de 2,5 à 15 mm³, afin d'avoir des résultats comparatifs.

Nous avons fait migrer parallèlement sur tous les chromatogrammes, des sucres témoins de référence (S. T. : saccharose, glucose, fructose et rhamnose).

Les solvants utilisés ont été soit le solvant de CHOLLET (acétate d'éthyle : 9 vol. ; acide acétique : 3 vol. ; eau : 4 vol.), qui donne de beaux spots circulaires, soit le solvant de PARTRIDGE (n. butanol : 4 vol. ; acide acétique : 1 vol. ; eau : 5 vol.). Le développement est toujours effectué à la température la plus constante possible ($23^{\circ} \pm 2^{\circ}$).

Dans les phases préliminaires de notre travail, nous avons employé la chromatographie ascendante, dans une cuve formée de deux bēchers de quatre litres à bords rodés, retournés l'un sur l'autre et « lutés » par une bande de sparadrap, le papier étant roulé en cylindre.

Par ce procédé, le développement ne pouvant guère dépasser 30 à 40 cm, les substances de faible Rf se séparent fort mal.

Nous avons donc, par la suite, préféré utiliser la chromatographie descendante en cuve de SHANDON, en prolongeant le temps de développement et en laissant le solvant s'écouler librement au bas de la feuille.

Pour révéler les différents sucres, après examen préalable des chromatogrammes en lumière ultra-violette, on pulvérise sur ceux-ci une solution de phloroglucine ou d'orcine chlorhydrique (1) pour caractériser les cétooses et le phtalate d'aniline (acide phtalique : 1,66 ; aniline : 0,93 ; butanol aqueux : 100 ml) qui met en évidence les aldoses. Les chromatogrammes étaient alors réalisés en double et migraient parallèlement dans la même cuve.

Le plus souvent, nous avons révélé aldoses et cétooses sur le même chromatogramme en pulvérisant successivement le réactif au phtalate, puis celui à l'urée chlorhydrique (DEDONDER, 1952) (urée : 5 g ; Hcl 2 N : 20 ml³ ; éthanol, Q. S. P. : 100 ml³).

Après chaque pulvérisation, les chromatogrammes sont portés à l'étuve à 70-80° pendant quatre à cinq minutes pour la phloroglucine et l'orcine et à 100-110° pendant trois à dix minutes pour le phtalate et l'urée.

Les glucides migrent d'autant plus loin que le nombre de leurs hydroxyles est moins grand et leur molécule plus petite. Les pentoses précèdent les hexoses et ceux-ci les diholosides. Les cétooses migrent plus vite que les aldoses.

II. RÉSULTATS. — Les résultats obtenus sont synthétisés dans les trois figures suivantes : 49, 50 et 51.

La figure 49 représente les sucres solubles contenus dans les Orobanches cueillies le 22 mai et le 13 juin (plante entière, fleurs à peine épanouies) et les racines de Lierre sur lesquelles étaient fixées ces dernières plantes récoltées. Saccharose, glucose et fructose se retrouvent pareillement dans le parasite et dans son hôte.

Par contre, certaines substances apparaissent dans les extraits d'Orobanche sans qu'on dénote leur présence dans le Lierre.

Tout d'abord, le parasite contient un sucre dont le Rf est compris entre 0,25 et 0,29 et qui se révèle par le phtalate d'aniline, aussi bien que par

(1) Solution aqueuse de phloroglucine ou d'orcine chlorhydrique à 1 p. 100..... = 1 vol.
Hcl 2 N..... — 9 vol.

l'urée et par la phloroglucine. Avec ce dernier réactif, il prend une teinte ocre.

La valeur de ce Rf et les réactions colorées obtenues paraissent être caractéristiques d'un pentose, et notamment du rhamnose.

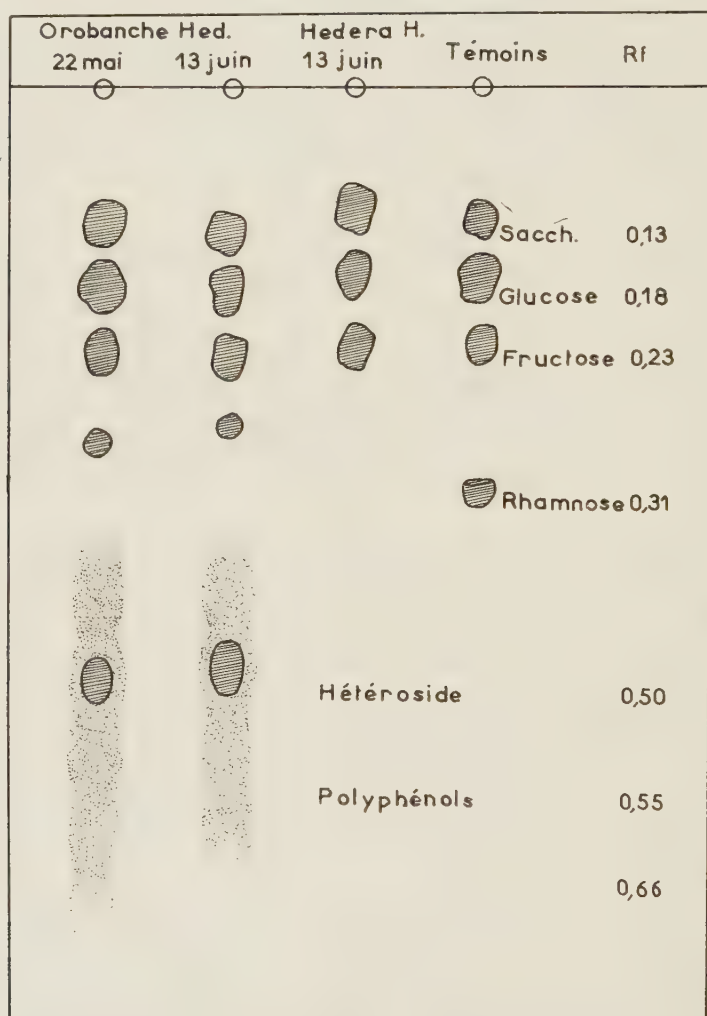


FIG. 49. — Chromatogrammes des sucres solubles d'*O. Hedera* (plantes entières, fleurs à peine épanouies, récoltées le 22 mai et 13 juin) et des racines d'*Hedera Helix* (récoltées le 13 juin). Extraits passés sur les résines échangeurs d'ions.

Nous avons fait migrer parallèlement celui-ci sur les mêmes chromatogrammes. Les réactions colorées ont été semblables. Les Rf, très voisins, mais jamais exactement identiques. La migration de ce pentose doit être perturbée par les autres substances existant dans l'*Orobanche*, et il ne nous a pas été possible jusqu'à présent de le caractériser exactement.

En outre, le parasite présente un autre spot glucidique de Rf 0,45 à 0,50, se révélant en gris bleu par l'urée, ocre clair par la phloroglucine, en rose avec l'orcine. Il ne correspond pas à un glucide connu. Ce spot est d'ailleurs entouré, en lumière ultra-violette, par un halo bleu vif fluores-

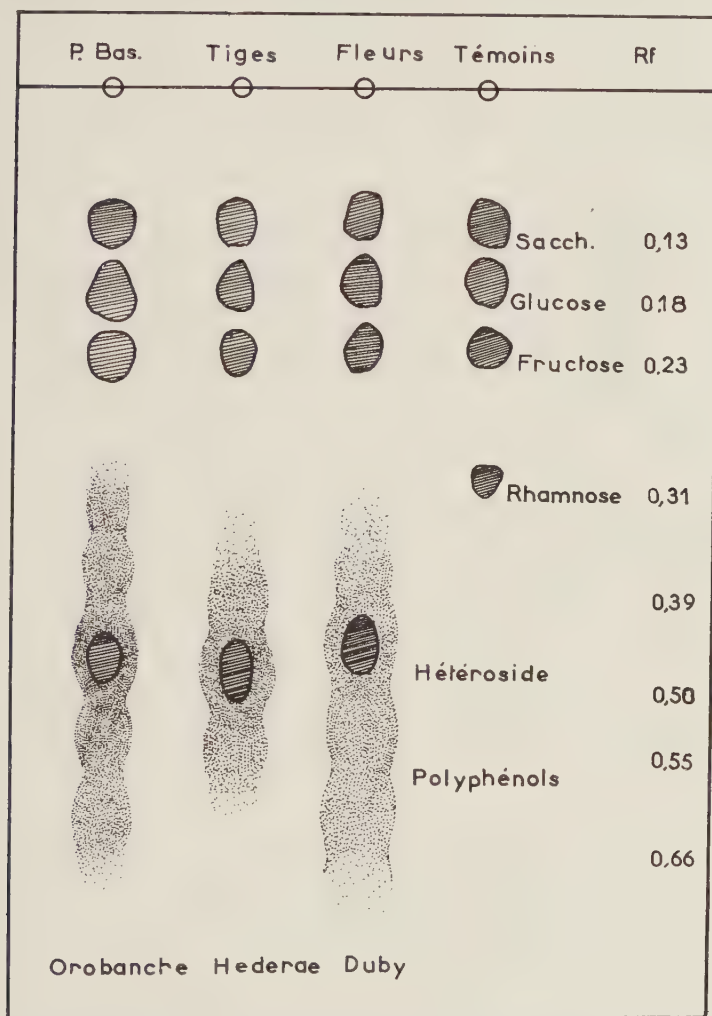


FIG. 50. — Chromatogramme des sucres solubles de fleurs, tiges et parties basales de l'Orobanche du Lierre. Extraits obtenus après passage sur échangeurs d'ions. Plantes récoltées le 10 juillet.

cent, devenant jaune verdâtre sous l'influence de vapeurs ammoniacales. Cette fluorescence se retrouve d'ailleurs identique en deçà et au delà du spot glucidique, sous forme d'une trainée, délimitant cependant quelques spots de Rf 0,39, 0,55 et 0,66.

Le NO_3Ag ammoniacal est réduit immédiatement à froid ; pulvérisé avec une solution de ferricyanure de potassium à 0,3 p. 100 et une solution

Dans la figure 50 sont représentés les chromatogrammes effectués sur les différents organes (partie basale, tige et fleurs) d'*O. Hederæ* récoltés le 10 juillet, au moment de son maximum de végétation.

Les résultats sont assez comparables à ceux des analyses effectuées en mai et juin. On retrouve dans les différents organes du parasite : le saccharose, le glucose, le fructose, l'hétéroside de Rf 0,45-0,50 et l'ensemble des spots de polyphénols.

Toutefois, le pentose (Rf 0,25-0,29) n'apparaît plus sur aucun chromatogramme. Ce sucre a donc disparu pendant que s'effectuait la maturation de la plante.

Notre attention a porté surtout sur la recherche du maltose. Ce sucre, à notre avis, devait pouvoir exister dans l'Orobanche, comme témoin de l'hydrolyse partielle de l'amidon, si abondant dans ses tissus, ou comme forme d'accumulation juxtaposée de ce polyholoside.

Mais, malgré le long cheminement des solvants sur nos chromatogrammes le maltose n'a pu être mis en évidence. Il est d'ailleurs assez rare à l'état libre, ou tout au moins doit exister à l'état de traces ; ce sucre a été assez rarement caractérisé d'une façon certaine dans les végétaux.

A notre connaissance, le maltose n'a été retrouvé que dans très peu d'espèces, notamment dans les tubercules d'*Aconitum Napellus* L. par S. LASCOMBES (1954 et 1955), et dans les graines de *Phelypæa ramosa*, après le sixième jour de la mise en germination, par IZARD (1958).

Dans la figure 51, représentant les chromatogrammes des diverses parties du Lierre (racines, tiges et feuilles) récoltées le 10 juillet, la composition glucidique n'a pas varié. Saccharose, glucose et fructose sont mis en évidence. Nous n'observons ni pentose, ni hétéroside, ni polyphénol dans la plante-hôte et dans aucun de ses organes.

Ces résultats, en ce qui concerne tout au moins les glucides de la feuille de Lierre, sont d'ailleurs en plein accord avec ceux très récents de JÉRÉMIAS (1958).

L'analyse chromatographique effectuée par cet auteur montre en effet, que du mois d'avril au mois de novembre, seuls le saccharose, le glucose et le fructose sont présents dans les tissus d'*Hedera Helix* L.; par contre, dès le mois de novembre, apparaissent en plus raffinose, stachyose et galactose, qui disparaissent à nouveau dès le mois de mars.

3^e Conclusions. — Peut-on, des résultats de ces recherches sur le matériel glucidique, se faire une opinion sur la façon dont s'opère la nutrition hydrocarbonée du parasite ?

L'Orobanche emprunterait au Lierre les sucres les plus simples : saccharose, fructose et glucose, puisque nous retrouvons les mêmes glucides dans l'hôte et le parasite.

D'autre part, la concentration glucidique totale (en sucres solubles) est plus importante dans le Lierre que dans l'Orobanche.

Cette différence de concentration existant entre les deux espèces pourrait donc drainer, en quelque sorte, de l'organe le plus concentré (la racine

du Lierre) vers le moins concentré (l'Orobanche) ces sucres, qui, d'ailleurs, se polymérisent très vite.

Dans quels tissus ce passage a-t-il lieu ? Il est très difficile de répondre à cette question tant que des expériences d'absorption n'auront pas été faites avec des molécules marquées suivies d'historadiogrammes.

Nous pensons, d'après l'union très intime qui existe entre les tissus de l'Orobanche et ceux du Lierre, que ce passage pourrait se faire directement de cellule à cellule par voie cytoplasmique. Il ne serait pas impossible aussi que les xylèmes étroitement raccordés jouent un rôle dans ce transport. Cette jonction vasculaire s'est d'ailleurs réalisée dans le Lierre au niveau d'un rayon médullaire qui, normalement, contient de l'amidon. Une sève riche en sucres pourrait donc, en partie, pénétrer aussi par cette voie.

Dans le Lierre, nous n'avons trouvé ni hétérosides, ni polyphénols, alors que ces substances abondent en toute période dans l'Orobanche.

Ces résultats pourraient donc suggérer que certaines synthèses particulières, qui n'ont pas lieu dans l'hôte, s'opèrent dans le parasite.

C'était d'ailleurs la conclusion d'une de nos précédentes notes (1958).

Mais, le fait que nous n'ayons trouvé ni hétérosides ni polyphénols dans les chromatogrammes du Lierre ne nous a pas paru une preuve suffisante pour affirmer leur absence dans la plante-hôte.

En effet, « la chromatographie, si sensible soit-elle, demande, pour révéler l'existence d'un corps, que celui-ci atteigne un certain taux » (CARLES, 1956, p. 138). Or, nous avons opéré l'étude de ces substances sur des extraits passés à travers des résines échangeurs d'ions, qui laissent bien passer les glucides, mais retiennent très souvent les polyphénols.

Aussi, afin de préciser cette question, avons-nous été amenés à entreprendre, par d'autres techniques, l'étude des substances polyphénoliques dans le Lierre et dans l'Orobanche.

Substances polyphénoliques.

1^o Caractérisation des polyphénols. — A. DANS L'OROBANCHE. — En 1924, BRIDEL et CHARAUX extrayaient de tubercules d'*Orobanche Rapum* Thuill. un glucoside, l'orobanchoside, dont l'hydrolyse donne du glucose, du rhamnose et, comme aglycone, un produit de décomposition de l'acide caféique. Par la suite, en 1925, ils retrouvaient le même hétéroside dans les tubercules d'*O. minor* Sutt. et *O. cruenta* Bert.

Soupçonnant, d'après nos précédents résultats, l'existence d'un hétéroside semblablement formé d'un aglycone polyphénolique dans l'Orobanche du Lierre, nous en avons entrepris l'extraction suivant la technique de ces auteurs.

Deux cents millilitres d'extrait BOURQUELOT représentant un poids égal d'*Orobanche Hederæ* (plante entière) sont distillés jusqu'à la formation d'un sirop épais. Cette masse visqueuse est reprise par l'eau bouillante et traitée à plusieurs reprises par l'acétate d'éthyle.

La solution éthéro-acétique est concentrée jusqu'à consistance pâteuse. Aucun cristal n'apparaît pendant la phase de refroidissement. Ce résidu présente néanmoins tous les caractères de solubilité des substances polyphénoliques : assez soluble dans l'eau, très soluble dans l'eau bouillante, l'alcool et l'acétone, insoluble dans le chloroforme et le benzène. Les réactions de coloration sont aussi identiques.

Dissout dans l'eau, il donne une coloration bleue intense avec le ferri-cyanure ferrique et chromatographié avec le solvant de PARTRIDGE, il présente une longue trainée, aux spots difficilement discernables, la plupart bleu fluorescent et certains devenant jaune verdâtre sous l'influence des vapeurs ammoniacales.

Cet extrait, trop complexe pour pouvoir être analysé ainsi, est alors repris par l'eau à ébullition et chromatographié par passage sur une colonne d'alumine.

Cette colonne est ensuite éluée successivement par l'eau froide, l'eau bouillante, l'acétate d'éthyle, le butanol et le solvant de PARTRIDGE. On obtient cinq fractions qui, concentrées, présentent les réactions suivantes figurées sur le tableau X.

TABLEAU X. — RÉACTIONS COLORÉES DES DIVERSES FRACTIONS OBTENUES APRÈS ÉLUTION DE L'EXTRAIT D'« OROBANCHE HEDERÆ », DE LA COLONNE D'ALUMINE.

FRACTIONS.	ÉLUTION PAR	RÉACTIONS COLORÉES.				PRODUITS SUPPOSÉS.
		U. V.	U. V. + NH ₄ OH	Réactif de Barton. (1)	Réactif d'Hœpfner. (2)	
1	eau froide.	Bleu.	Bleu.	±	±	Acide caféique.
2	eau bouillante.	Bleu.	Bleu.	+++	Brun.	—
3	acétate d'éthyle.	Bleu.	Bleu.	+++	Brun.	—
4	butanol.	Bleu.	Bleu.	+++	Brun.	—
5	solvant de Partridge.	Bleu.	Jaune-vert.	+++	Jaune-rouge.	Acide chlorogénique.

(1) Réactif de BARTON (1952) : mélange extemporané à parties égales d'une solution de ferri-cyanure de potassium à 0,3 p. 100 et de chlorure ferrique à 0,3 p. 100. Les composés phénoliques apparaissent en bleu intense.

(2) Réactif d'HœPFNER (1932) : on pulvérise une solution de nitrite de sodium à 5 p. 100 acidifiée par 2 gouttes de SO₄H₂ 1/2 pour 10 ml de réactif. Une coloration jaune apparaît avec certains polyphénols. Puis, par pulvérisation d'une solution de NaOH N, l'acide chlorogénique donne une coloration rouge et l'acide caféique, une coloration brune.

Ces réactions indiquent donc la présence probable dans l'extrait de l'*Orobanche* du Lierre, préparé suivant la méthode de BRIDEL et CHARAUX, des acides caféique et chlorogénique ou de leurs dérivés.

Une chromatographie sur papier de chaque fraction est alors effectuée (phase descendante, papier Arches 302, solvant de PARTRIDGE, température $24^{\circ} \pm 2^{\circ}$). Sur chaque chromatogramme, on fait migrer parallèlement des solutions étalons d'acides caféique et chlorogénique.

Les premières fractions ont donné des spots difficilement interprétables. Par contre, la fraction n° 4 éluée avec le butanol et la fraction n° 5 éluée par le solvant de PARTRIDGE présentent une série de spots très nettement séparés.

Les résultats sont représentés sur le tableau XI et sur la figure 52.

TABLEAU XI. — CARACTÉRISATION DES SPOTS OBTENUS EN CHROMATOGRAPHIANT LES DIVERSES FRACTIONS DE L'EXTRAIT D'« OROBANCHE HEDERÆ » ÉLUÉES APRÈS PASSAGE SUR COLONNE D'ALUMINE. (Chromatographie : solvant de Partridge.)

SPOT.	Rf.	U.-V.	U.-V. + NH ₄ OH	PHTALATE D'ANILINE.	SUBSTANCES IDENTIFIÉES.
I	0,09	Bleu.	Jaune-vert.	Brun.	Hétéroside I (?)
II	0,23	—	Bleu.	Brun.	Hétéroside II (?)
III	0,59	—	Jaune-vert.	0	Isomère d'un acide chlorogénique (?)
IV	0,66	—	—	0	Acide néochlorogénique (?)
V	0,73	—	—	0	Acide chlorogénique.
VI	0,84	—	Bleu.	0	Acide caféique.
VII	0,96	Gris-bleu.	—	0	Acide méthylcaféique (?)

L'extrait d'*Orobanche Hederæ* préparé suivant la technique BRIDEL et CHARAUX contient donc plusieurs substances polyphénoliques.

Le spot I (Rf 0,09) obtenu avec la fraction 3 (acétate d'éthyle) est très complexe. Il se révèle avec les réactifs des sucres (phtalate d'aniline) aussi bien qu'en lumière de Wood.

Nous pensons là être en présence d'un hétéroside formé d'un aldose et de plusieurs polyphénols (acide caféique, acide chlorogénique ou leurs dérivés).

Le spot II (Rf 0,23) semble aussi être un hétéroside très voisin, mais formé d'un seul polyphénol comme aglycone.

N'ayant pu obtenir jusqu'à présent ces corps à l'état cristallisé, il nous a été impossible d'en déterminer plus exactement la composition.

Ceci fera l'objet d'études ultérieures.

Les spots III, IV et V, sont voisins comme Rf (0,59, 0,66 et 0,73), mais cependant nettement séparés. Ils représentent très vraisemblablement des isomères de l'acide chlorogénique.

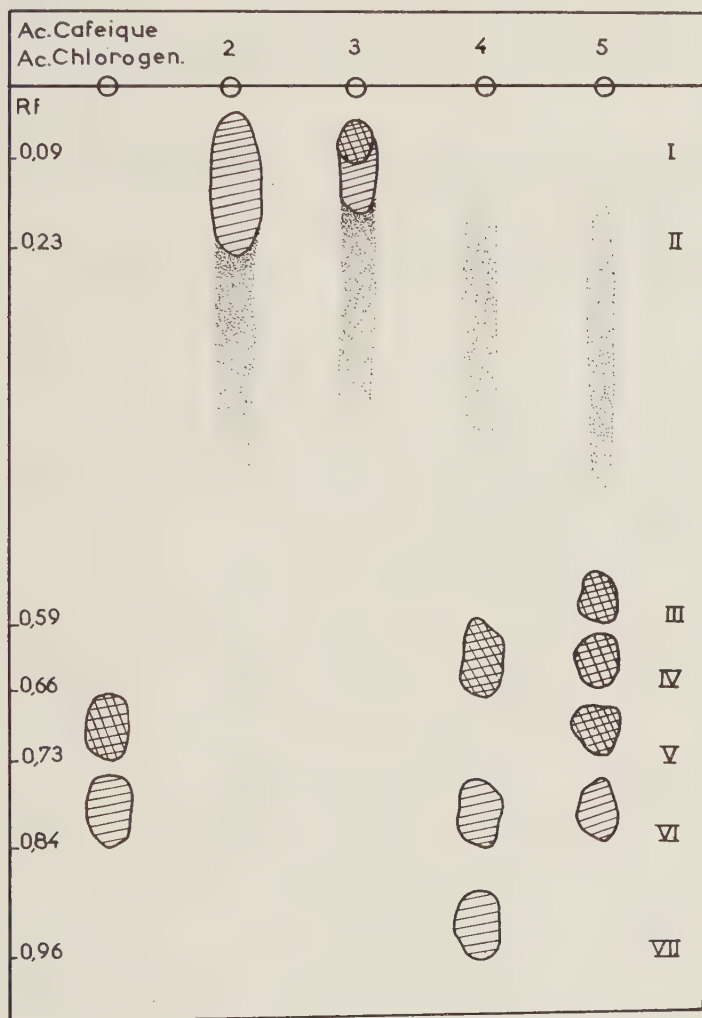


FIG. 52. — Chromatogramme des différentes fractions de l'extract d'*O. Hederæ* éluées de la colonne d'alumine.

Fraction 2 : eau bouillante ; Fr. 3 : acétate d'éthyle ; Fr. 4 : butanol ; Fr. 5 : solv. de Partridge. Révélation : U. V. + NH_4OH ; spots rayés : restent bleu ; spots quadrillés : deviennent jaune verdâtre.

Témoins : acide caféique (Rf. : 0,84) et acide chlorogénique (Rf. : 0,73).

Le spot V est certainement l'acide chlorogénique lui-même (Rf 0,73). Il migre exactement au même niveau que l'acide de référence et nous avons d'ailleurs par la suite réussi à l'obtenir cristallisé à l'état pur.

Le spot IV (Rf 0,66) semble être celui de l'acide néochlorogénique

(Rf : $0,65 \pm 0,02$ d'après WOLF, 1958, p. 131), et le spot III (Rf 0,59), celui d'un isomère de l'acide chlorogénique encore indéterminé.

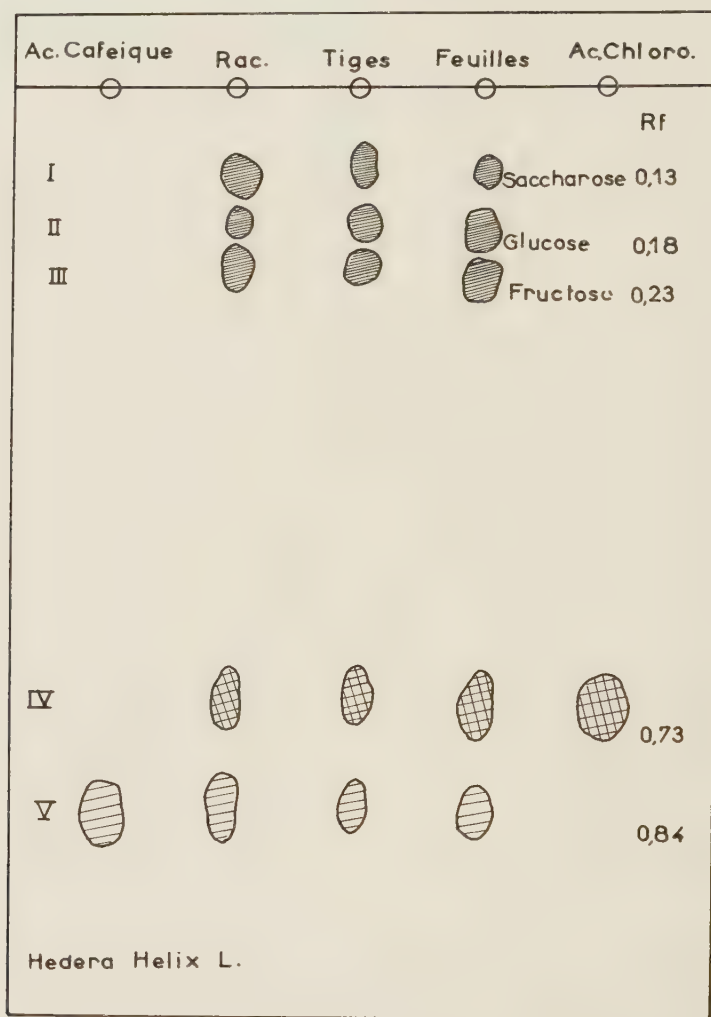


FIG. 53. — Chromatogramme effectué avec des extraits alcooliques (méthode de BRIDEL et CHARAUX) de racines, tiges et feuilles d'*Hederà Helix* non passés sur les échangeurs d'ions.

Solv. de Partridge. Témoins : acide caféique (Rf. : 0,84) et acide chlorogénique (Rf. : 0,73). Révélation : U. V., U. V. + NH_4OH , Phtalate d'aniline.

Le spot VI a tous les caractères de l'acide caféique, son Rf (0,84) est d'ailleurs le même que celui de l'acide caféique étalon.

Enfin le spot VII (Rf. 0,96) paraît être un dérivé plus ou moins méthoxylé de l'acide caféique (?) (ac. 3-4-méthoxy-cinnamique : Rf 0,94, d'après PAECH et TRACEY, III, p. 478).

B. DANS LE LIERRE. — Nous avons opéré suivant les mêmes techniques vis-à-vis des feuilles, tiges et racines de Lierre récoltées le 10 juillet.

La chromatographie a été directement opérée sur l'extrait lui-même, sans passer par la colonne d'alumine.

Les résultats sont schématisés dans la figure 53.

Les mêmes sucres (saccharose, glucose et fructose), déjà caractérisés, lors des études précédentes, avec les extraits passés sur les échangeurs d'ions, se retrouvent ici.

Mais, par contre, apparaissent dans tous les organes du Lierre, l'acide caféique (Rf. 0,84) et l'acide chlorogénique (Rf. 0,73), que les résines avaient certainement auparavant retenus.

La présence d'une substance voisine de l'acide chlorogénique a déjà été signalée dans les feuilles de Lierre par RUCKENBROD, en 1955, et en 1958, URBAN caractérise, dans les mêmes organes, ces deux acides.

2° Isolement de l'acide chlorogénique. — A. TECHNIQUES. — L'existence de l'acide chlorogénique dans certaines Orobanches (*O. Rapum*, *O. Epithymum* et *Phelypæa lutea*) avait été signalée, dès 1910, par CHARAUX. Mais cet auteur, pour affirmer la présence de ce composé, se basait, d'une part sur la réaction colorée au chlorure ferrique de GORTER, et, d'autre part, sur l'isolement des tissus de ces espèces, de l'acide caféique. Or, la réaction de GORTER n'est nullement spécifique de l'acide chlorogénique : elle caractérise, en principe, les orthodiphénols, et l'acide caféique peut fort bien exister à l'état libre (comme nous l'avons déjà observé) sans qu'il soit le résultat obligatoire du dédoublement d'un autre corps.

Pour entreprendre l'isolement de cet acide, nous avons tout d'abord mis à profit les techniques de KIERMEIR (1955), de KRETOVITCH (1954), de PAECH et TRACEY (1955, 3, p. 426), basées toutes sur la précipitation par les sels de plomb et celle de GUSEVA (1954) qui emploie l'éther anhydre en milieu sulfurique. Mais les résultats ont été décevants.

Après de très nombreux essais, c'est l'extraction directe à l'acétate d'éthyle qui nous a permis d'isoler l'acide chlorogénique à l'état cristallisé.

50 g de tiges d'*O. Hederæ*, sont desséchées sous courant d'air chaud à une température inférieure à 50° C, puis pulvérisées et extraites dans un appareil de Soxhlet avec 250 ml d'acétate d'éthyle R. P. pendant vingt-quatre heures. Par refroidissement, l'extrait acétylé jaune clair devient trouble et laisse déposer une masse crayeuse blanc jaunâtre. Cet extrait est alors évaporé. Il donne un résidu cristallin légèrement brun qui est repris par 50 ml d'eau bouillante et filtré. Sur le filtre demeure une substance résineuse brune. Le filtrat est alors refroidi à + 1° C. Les cristaux qui se forment sont essorés et repris quatre fois par l'eau à ébullition et recristallisés à froid. Après nouvel essorage et dessiccation sous vide, on obtient 0,174 g de cristaux en fines aiguilles incolores (cf fig. 54), inodores, fondant instantanément au bloc de Maquenne à 208-209° C (acide chlorogénique P. F. : 205°, GUSEVA, 1954; 206° : KRETOVITCH, 1954; 208° : PAECH et TRACEY, 1955, et HERRMANN, 1956).

Ces cristaux sont solubles dans l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'eau bouillante, très peu solubles dans l'eau froide et insolubles dans le chloroforme et le sulfure de carbone.

Une solution alcoolique à 1 p. 100 de ce composé, chromatographiée sur papier Arches 302 dans le solvant de PARTRIDGE, montre, après séchage, un spot unique ($R_f 0,73 \pm 0,02$) bleu fluorescent en lumière ultra-violette, devenant jaune verdâtre sous l'action de vapeurs ammoniacales.



FIG. 54. — Cristaux d'acide chlorogénique isolés des tissus d'*O. Hedera* D. ($\times 480$.)

Ce spot présente en outre un ensemble de réactions caractéristiques : le nitrate d'argent ammoniacal (1) est réduit immédiatement à froid ; les solutions alcalines le colorent en jaune clair, virant après un certain temps au vert. Après le ferricyanure ferrique (R. de BARTON), il présente une teinte bleu vif. Pulvérisé avec l'acide phosphomolybdique à 2 p. 100, il devient, après passage en atmosphère ammoniacale, bleu sombre. Après le réactif d'HÆPFNER, ce spot, coloré en jaune, vire, au contact d'alcalis concentrés, au rouge carmin brillant.

Le spectre ultra-violet (2) de ces cristaux, en solution à 50 mg p. 100 dans l'éthanol redistillé, présente un maximum d'absorption vers $328 m\mu$, ainsi qu'un épaulement vers $300 m\mu$ (cf. fig. 55). L'allure générale de la courbe est identique aux spectrogrammes de l'acide chlorogénique obtenu par JOHNSON et collaborateurs (1951 et 1952) et WILLIAMS, 1958.

(1) Mélanger, en parties égales, une solution de NO_3Ag 0,1N et une solution d'ammoniaque 0,1N. Ajouter une goutte d'acide acétique pour 5 ml de solution. (CARLES et coll., 1958).

(2) Déterminé au laboratoire de chimie organique du professeur GRANGER par le Dr LANET, que nous remercions bien vivement.

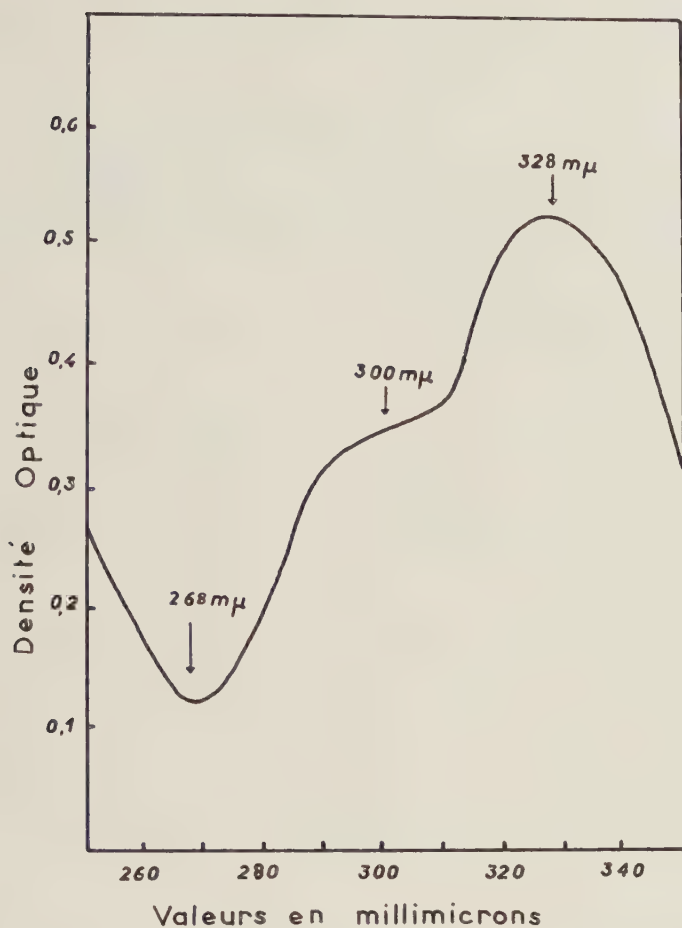
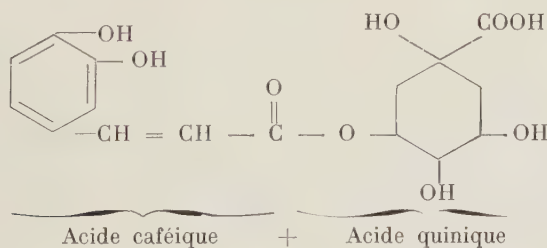


FIG. 55. — Spectre U.-V. de l'acide chlorogénique obtenu à l'état cristallin des tissus d'*O. Hederæ* D.

Acide chlorogénique.



L'acide chlorogénique est un depside de l'acide quinique et de l'acide caféique.

Cet acide a été isolé jusqu'à présent à l'état cristallisé d'une douzaine d'espèces seulement, toutes angiospermes, bien que sa présence ait été

reconnue par les techniques chromatographiques dans un nombre important de plantes (plus de 50 espèces appartenant à près de 40 genres).

B. LOCALISATION DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE OU DE SES DÉRIVÉS DANS LES TISSUS D'« OROBANCHE HEDERÆ ». — POLITIS, en 1947, avait mis au point une technique pour caractériser microchimiquement l'acide chlorogénique qui, sous l'influence des vapeurs d'une solution ammoniacale à 20 p. 100, colore les tissus en vert. Il a, par cette méthode, suivi la localisation de cet acide dans un nombre important de Solanacées (1948) et de Composées (1949).

Mais il est souvent hasardeux d'affirmer l'existence de tel ou tel composé dans un végétal sous le seul critère d'une réaction colorée sans l'avoir auparavant isolé. MIRANDE, en 1907, en se basant sur la formation d'un précipité noir sous l'action, à chaud, de l'acide sulfurique dilué, avait affirmé la présence de rhinanthine dans les Orobanches, et notamment *O. Hederæ*. Mais BRIDEL, en 1924, infirmait ces résultats.

Nous avons néanmoins voulu, après avoir caractérisé nettement l'acide chlorogénique dans l'Orobanche du Lierre, préciser sa localisation dans les différents tissus.

A un pH alcalin et à chaud, les polyphénoloxydases tissulaires déterminent une coloration verte avec les esters de l'acide caféique, une coloration rouge brun avec l'acide caféique et ses dérivés, et brune avec les tanins (URITANI, 1953).

D'après la coloration vert sombre obtenue en plongeant différentes sections d'*O. Hederæ* dans une solution de CO_3HNa à pH 9,1 portée à une température de 50°, on peut penser que l'acide chlorogénique ou des composés voisins se localisent surtout dans la zone corticale de toute la plante et dans la région médullaire de la partie souterraine.

C. RELATIONS ENTRE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE ET LE BRUNISSEMENT DE L'OROBANCHE. — BRIDEL et CHARAUX avaient, en 1925, étudié les processus du brunissement des Orobanches et concluaient que le changement de couleur de ces plantes était dû à un ferment oxydant agissant sur l'orobanchoside.

Nous avons repris en partie leur expérimentation en partant non de l'hétéroside, mais de l'acide chlorogénique lui-même.

Une émulsion hydro-alcoolique de résine de gaïac fraîchement préparée colore en bleu très intense toute la zone corticale de la plante, ainsi que la région médullaire de la partie basale. Une quantité importante d'oxydase existe donc dans ces cellules et se localise d'ailleurs exactement au même niveau que les esters de l'acide caféique.

Si on mélange un broyat cellulaire d'Orobanche du Lierre, frais ou même desséché sous vide, à une solution incolore d'acide chlorogénique, cette solution devient jaune, puis, en quelques heures, prend une teinte brun foncé.

Lorsqu'on coupe un tubercule ou une tige d'Orobanche, on constate que

la surface de la section passe très rapidement, au contact de l'air, du jaune clair au brunâtre. Ce noircissement résulte donc de l'oxydation des polyphénols se trouvant à l'état libre dans ces tissus.

Afin de vérifier et la nature de l'oxydase et la nature du substrat oxydé, nous avons effectué l'expérience suivante :

Un broyat cellulaire frais d'*O. Hederæ* est mis en contact dans une série de tubes à essai avec des solutions d'acides organiques, d'acides phénoliques, d'orthodiphénols et de triphénols (cf tableau XII). En un

TABLEAU XII. — ACTION D'UN BROYAT CELLULAIRE FRAIS D'« OROBANCHE HEDERÆ » (POLYPHÉNOLOXYDASE) SUR DES SOLUTIONS DE DIVERS COMPOSÉS ORGANIQUES.

ACIDES EN SOLUTION, MIS AU CONTACT D'UN BROYAT CELLULAIRE D'« OROBANCHE HEDERÆ ».		COLORATION OBSERVÉE.
Acides organiques non phénoliques.	Acide cinnamique.	Incolore.
	Acide quinique.	—
Acides phénoliques	Acide salicylique.	—
	Acide coumarique.	—
	Acide protocatéchique.	Brun rougeâtre
Orthodiphénols	Acide caféique.	—
	Acide chlorogénique.	Brun noirâtre.
	Pyrocatechol.	—
Triphénols	Acide gallique.	Jaune pâle.

temps inférieur à une heure, on note la couleur des solutions contenues dans les tubes.

Seuls les orthodiphénols ont été oxydés. L'oxydase semble donc être une orthodiphénolase.

D. RÔLE PHYSIOLOGIQUE DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE. — L'acide chlorogénique joue très probablement un rôle important dans les Orobanches. D'après CHARAUX, « le bulbe d'*O. Rapum* est à signaler pour sa richesse exceptionnelle en acide chlorogénique qui est au moins de 20 p. 100 à une certaine époque de sa végétation » (*loc. cit.*, 1910, p. 294).

Dans nos recherches sur *O. Hederæ*, le taux de cet acide ne dépassait pas 1,4 g p. 100 en poids frais. Il est vrai que nous l'avons dosé à l'état libre. Il doit certainement exister en quantité beaucoup plus importante, combiné avec des glucides sous forme d'hétérosides. Ce doit être

très vraisemblablement la fraction caféique ou chlorogénique, qui, dans ces hétérosides, est responsable du brunissement de la plante.

Un très grand nombre de recherches ont lieu actuellement sur le rôle de ces composés dans les plantes, sans parler de leur utilisation en thérapeutique comme antibiotiques (DUQUENOIS, 1956).

Ces acides participent à la synthèse des flavones, et des anthocyanes ; ils représentent un élément très important, avec leurs oxydases spécifiques, dans les réactions de respiration végétale (JAMES, 1954).

L'acide chlorogénique lui-même interviendrait dans les phénomènes de résistance des plantes aux maladies, notamment dans le Cacao (GRIFFITHS, 1958).

Dans les pommes « Cox », la diminution de cet acide en août s'accorde avec une plus grande sensibilité des fruits à l'attaque du champignon *Glæosporium* (HULME, 1958).

Il arrête l'attaque des feuilles des poiriers et pommiers par le champignon *Venturia* (KIRKHAM, 1957).

Les variétés de pommes de terre résistantes au *Phytophthora infestans* en sont plus riches que les variétés non résistantes.

D'autre part, il paraît être directement en cause dans la formation de l'assise subéro-phellodermique, et se comporterait dans ce cas comme « hormone de blessure ». Cet acide, ajouté à une surface fraîchement coupée d'un tubercule, rend plus rapide la production de tissus subérisés (JOHNSON, 1952 ; KUC, 1956).

Enfin, si on a pu identifier l'acide chlorogénique à un inhibiteur de croissance (SHIBOAKA, 1957, et VARGA, 1959), on peut penser que, dans certains cas, au contraire, de par sa structure orthodiphénolique, il activerait, l'action de l'auxine (acide indolacétique) et aboutirait ainsi à former un complexe actif sur la croissance végétale (FRITSHE et BOUILLENNE, 1958, p. 187).

Nous avons d'ailleurs, en partie, vérifié cette hypothèse en faisant

TABLEAU XIII. — ACTION DE L'ACIDE CHLOROGÉNIQUE SUR L'ÉLONGATION DE PLANTULES DE BLÉ. (Résultats calculés en millimètres sur une moyenne de 10 plantules après 6 jours d'expérimentation.)

	ÉLONGATION DES PLANTULES DE BLÉ.
Acide chlorogénique $5 \cdot 10^{-3}$	5,9 mm
— — — $5 \cdot 10^{-4}$	36,4 mm
— — — $5 \cdot 10^{-5}$	42,3 mm
— — — $5 \cdot 10^{-6}$	37,6 mm
Témoin OH_2	24,4 mm

agir sur des « grains » de blé, l'acide chlorogénique à des concentrations de $5 \cdot 10^{-3}$ à $5 \cdot 10^{-6}$; dix « grains » sont placés dans chaque boîte de Pétri avec 10 ml de chaque concentration en acide. Si aucune action ne se manifeste sur la germination proprement dite, les concentrations de $5 \cdot 10^{-4}$ et surtout $5 \cdot 10^{-5}$ ont accéléré nettement, par contre, l'élongation des germes. La concentration de $5 \cdot 10^{-3}$ est inhibitrice (cf. tableau XIII).

Après avoir effectué ces essais fragmentaires, paraissent successivement deux notes confirmant d'une façon beaucoup plus précise et rigoureuse nos résultats.

L'acide chlorogénique synergise par lui-même l'action de l'auxine en la protégeant contre sa propre oxydation et se conduirait donc comme un facteur de croissance (NITSCH, 1959), mais inactive l'auxine en présence d'orthodiphénol-oxydase et jouerait donc le rôle d'inhibiteur (TOMASZEWSKI, 1959).

Ainsi apparaissent vraisemblables les contradictions qui semblaient exister jusqu'à présent dans l'action physiologique de ce polyphénol, particulièrement abondant dans l'Orobanche.

Cela expliquerait-il et l'inhibition des graines et le développement particulièrement rapide de la hampe florale ?

Beaucoup de recherches sont encore à entreprendre avant de répondre à cette question.

3^o Conclusion. — La recherche des substances polyphénoliques a permis de mettre en évidence, dans l'Orobanche, les acides caféique et chlorogénique, certains de leurs dérivés et isomères, et plusieurs hétérosides qu'il n'a pas été possible jusqu'à présent d'identifier.

Les analyses effectuées sur les divers organes du Lierre ont révélé la présence des mêmes acides caféique et chlorogénique.

Bien qu'il ne soit pas, *a priori*, impossible que le parasite synthétise lui-même ces acides, leur absorption directe à partir de l'hôte paraît plus probable.

A notre avis, non seulement les sucres solubles (glucose, saccharose, fructose), mais aussi un certain nombre d'autres substances doivent très vraisemblablement pénétrer de la racine du Lierre dans l'Orobanche.

Celle-ci doit, par la suite, intégrer ces molécules dans ses divers métabolismes, les transformer et réaliser ainsi des synthèses nouvelles.

Le problème de l'absorption par un parasite de substances ayant un poids moléculaire relativement élevé a tout récemment été étudié chez diverses espèces de Cuscutes fixées sur *Digitalis purpurea* et *D. lanata* par GRIMMER (1958). Les résultats de cet auteur montrent que « les glucosides qui ont un poids moléculaire très petit sont absorbés par le parasite... mais, avec l'augmentation du poids moléculaire, l'absorption des glucosides est de plus en plus gênée et finalement cesse complètement » (*loc. cit.*, p. 672).

Ainsi, parmi les hétérosides existant dans *Digitalis purpurea*, le strospséside (P. M. : 550) se retrouve en quantité importante dans *Cuscuta arvensis*, alors que la digitoxine (P. M. : 764) n'est pas absorbée.

Ces résultats sont très importants et ils confirment absolument notre point de vue.

En effet, l'opinion généralement répandue à ce sujet limite exclusivement aux éléments simples (sels minéraux, oses, par exemple) ce que le parasite reçoit de l'hôte.

Les travaux de GRIMMER viennent, pour la première fois, affirmer que des substances qui sont pourtant spécifiques, comme les glucosides digitaliques, peuvent migrer à travers deux partenaires. Les échanges entre hôtes et parasites doivent être très certainement beaucoup plus importants qu'on ne le pensait jusqu'à présent.

Substances azotées.

Parallèlement à l'étude des substances glucidiques, nous avons suivi les diverses matières azotées au cours de la croissance de l'Orobanche, ensuite dans les organes de la plante adulte et enfin dans le Lievre. Nous nous sommes attachés plus particulièrement à caractériser les acides aminés, forme azotée la plus facilement assimilable et base de tous les métabolismes protidiques.

1^o Répartition et évolution. — A. TECHNIQUES. — Sur le matériel végétal, desséché et pulvérisé, nous avons dosé l'azote total, protéique et non protéique, organique et minéral.

Pour les constituants azotés totaux, la méthode de KJELDAHL-JOLDBAUER (1886), modifiée par SAINT-AMAND (1958), a été utilisée.

Les constituants protéiques sont dosés, après filtration, sur le résidu du broyage de la poudre végétale avec une solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100, selon la technique indiquée par GERTRUDE (1937).

L'azote non protéique ou soluble est dosé sur le filtrat, ou obtenu par la différence : N total — N protéique.

Les constituants azotés organiques sont évalués suivant la méthode de BOUGY (1933), après élimination des dérivés nitrés, par chauffage de la poudre avec une solution saturée de Cl_3Fe en milieu chlorhydrique. L'azote minéral est estimé par différence : N total — N organique.

B. RÉSULTATS. — Le tableau XIV exprime les variations des diverses formes d'azote au cours des différents stades de végétation de l'Orobanche.

Les dosages ont été opérés sur des plantes entières récoltées le même jour et d'une taille variant de 3 à 60 cm.

Tous les stades sont représentés, depuis les bourgeons floraux à peine formés (stade 7 cm), les premières fleurs épanouies (stade 15 cm) et les fruits mûrs (stade 30 cm).

Les résultats obtenus se caractérisent, dans leur ensemble, par une très grande stabilité de toutes les formes d'azote au cours de l'évolution de l'Orobanche. Ni la floraison, ni la fructification ne semblent avoir apporté

TABLEAU XIV. — VARIATIONS DES SUBSTANCES AZOTÉES, D'« OROBANCHE HEDERÆ » AU COURS DE SA CROISSANCE. (Valeurs exprimées en grammes d'azote pour 100 g de plante sèche entière.)

« OROBANCHE HEDERÆ » Plantes entières récoltées le 13 juin.		N TOTAL.	N PROTÉIQUE (insoluble).	N NON PROTÉIQUE.	N ORGANIQUE.	N MINÉRAL.
Taille	3 cm	0,75	0,55	0,20	0,72	0,03
—	7 cm	0,78	0,58	0,20	0,76	0,02
—	12 cm	0,70	0,52	0,18	0,68	0,02
—	15 cm	0,74	0,57	0,17	0,72	0,02
—	20 cm	0,73	0,58	0,15	0,71	0,02
—	30 cm	0,72	0,56	0,16	0,70	0,02
—	60 cm	0,73	0,56	0,17	0,70	0,03

de perturbations au déroulement du métabolisme protidique de la plante entière. Les différentes synthèses azotées doivent être très vraisemblablement équilibrées et les échanges très rapides ne permettent pas de mettre ainsi en évidence des variations particulières au cours du développement.

MIRANDE, en 1907, avait effectué la caractérisation microchimique des nitrates dans les Orobanches et plus particulièrement dans *O. Hederæ*.

Devant les résultats négatifs de ses recherches, il concluait : « En résumé, les plantes phanérogames parasites sans chlorophylle ne puisent pas de nitrate au sein de leur plante hospitalière... Les plantes parasites incolores, ne pouvant effectuer la réduction des nitrates, puisent, dans l'hôte, l'azote à l'état de combinaison organique » (*loc. cit.*, p. 508).

Par contre, les dosages chimiques réalisés par LUTZ en 1908 et 1912, indiquent, au contraire, « une teneur en azotate sensiblement supérieure chez les parasites sans chlorophylle » (*loc. cit.*, 1908, p. 1249).

L'Orobanche du Lierre, comme le prouvent nos résultats, contient réellement une certaine proportion d'azote minéral, mais en quantité relativement minime, sans qu'on puisse supposer un rapport quelconque avec l'absence de chlorophylle.

Le tableau XV représente l'évolution du matériel azoté dans les différents organes d'une Orobanche du Lierre en pleine végétation (10 juillet), comprenant aussi bien des fleurs à peine épanouies que des fruits déjà mûrs.

Les mêmes dosages ont été réalisés sur le Lierre, les racines étant prélevées au niveau exact du point d'implantation du parasite.

Les premières analyses n'avaient pas fait apparaître de différences notables au cours de la croissance de la plante entière. Il n'en est pas de même dans l'étude de chaque organe.

La distribution des matières azotées est alors nettement différente. Tiges et parties basales ont des taux sensiblement voisins de ceux déjà

TABEAU XV. — VARIATIONS DES SUBSTANCES AZOTÉES DANS LES DIVERS ORGANES DU LIERRE ET DE SON PARASITE, L'OROBANCHE, AU MOMENT DE SON PLEIN DÉVELOPPEMENT. (Valeurs exprimées en grammes d'azote pour 100 g d'organes desséchés.)

	N TOTAL.	N PROTÉIQUE.	N NON PROTÉIQUE.	N ORGANIQUE.	N MINÉRAL.
<i>Orobanche Hederae.</i>					
Parties basales.	0,70	0,66	0,14	0,64	0,06
Tiges	0,77	0,55	0,22	0,74	0,03
Fleurs	0,98	0,85	0,13	0,95	0,03
Graines	1,30	1,13	0,17	1,29	0,01
<i>Hedera Helix.</i>					
Racines	1,21	0,87	0,34	1,06	0,15
Tiges	0,70	0,54	0,16	0,58	0,12
Feuilles	1,18	0,95	0,23	1,12	0,06

obtenus sur les plantes entières. Ces organes représentent d'ailleurs, pondéralement, la partie la plus importante de la plante. L'azote minéral est néanmoins plus abondant dans la région de l'Orobanche directement en contact avec l'hôte. L'azote non protéique, c'est-à-dire l'azote soluble, représenté surtout par les acides aminés, domine dans la tige, organe de transport de ces substances facilement assimilables.

La protéogenèse est beaucoup plus intense dans les fleurs et surtout dans les graines, où la concentration en azote protéique est considérable. L'azote minéral, par contre, n'existe plus qu'en très faible quantité dans ces derniers organes.

Les constituants azotés sont plus abondants dans la plante-hôte, notamment dans la racine, où les taux d'azote non protéique et minéral sont deux fois plus élevés que dans le parasite.

Il n'y a donc pas, tout au moins pour l'Orobanche du Lierre, une accumulation particulière de matières azotées dans le parasite.

L'évolution protidique s'effectue suivant un processus normal. La migration de ces substances, se fait comme dans tout végétal, vers les fleurs, les fruits et les graines où ces substances s'accumulent ; l'azote minéral suit une destinée inverse.

On retrouve dans les mêmes organes des concentrations proportionnellement aussi élevées en matières azotées qu'en substances glucidiques.

La grosseur des molécules protidiques et leur état colloïdal s'opposant à leur transport à travers la plante, c'est donc dans les organes du parasite que s'effectue la synthèse de ces composés.

2^o Caractérisation et évolution des acides aminés. — A. TECHNIQUES. Notre étude a porté sur les mêmes plantes où furent caractérisés les glucides solubles. Les premières recherches ont porté sur l'évolution des acides aminés dans la plante entière au début de son développement (13 juin) et à la fin (10 juillet). Puis, au moment du plein épanouissement

de l'Orobanche, nous avons étudié chaque organe, comparativement avec le Lierre.

Les plantes ont été semblablement stabilisées par la méthode de BOURQUELOT. Les extraits, repris par l'alcool à 50°, sont passés sur des résines cationiques (Permutite C 50 D). Après élution à l'ammoniaque *N*, l'éluat

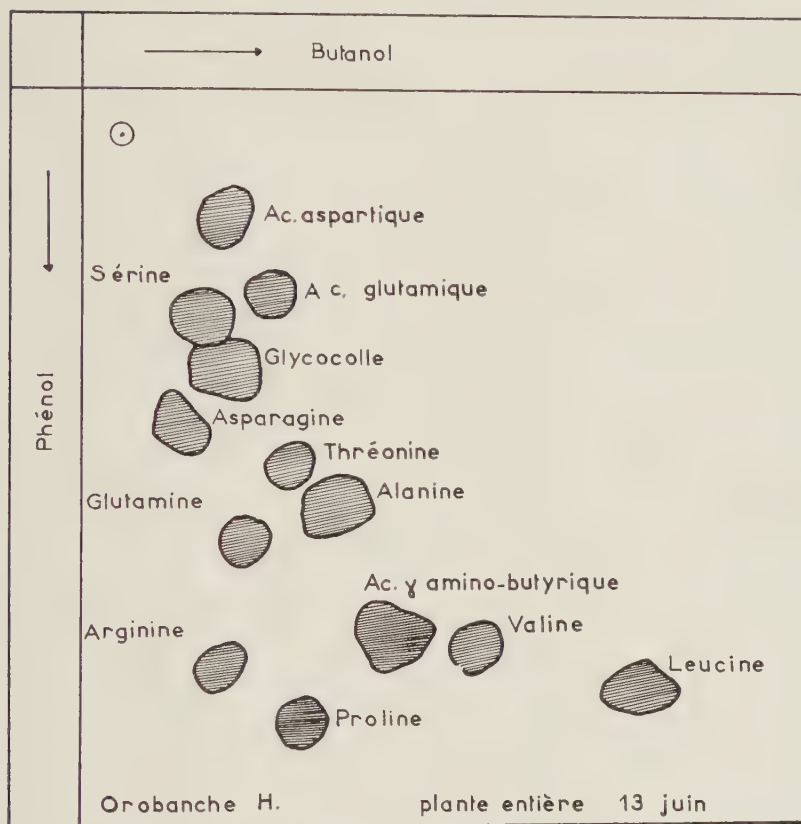


FIG. 56. — Chromatogramme des acides aminés libres contenus dans l'Orobanche du Lierre. (Plante entière. Fleurs non épanouies, 13 juin.)

est concentré sous vide, puis repris à nouveau par l'alcool à 50°. L'extrait d'acides aminés est alors analysé en chromatographie descendante bidimensionnelle sur papier Arches 302. Le volume de chaque solution déposée sur le papier est identique de manière à pouvoir différencier les variations possibles du taux de chaque acide.

Les solvants employés sont, pour la première dimension, le mélange butanol-acide acétique-eau (73-10-17) (HUGUET, 1955) et, pour la deuxième, la phase non aqueuse du mélange phénol saturé d'eau, additionné de 1 p. 1 000 d'ammoniaque.

Après séchage très soigneux à une température inférieure à 60°, les chromatogrammes sont révélés par pulvérisation de ninhydrine (solution

TABEAU XVI. — ACIDES AMINÉS CARACTÉRISÉS DANS L'OROBANCHE A DIFFÉRENTS STADES DE SON DÉVELOPPEMENT ET DANS SES DIVERS ORGANES, COMPARATIVEMENT A SON HÔTE, LE LIERRE. (Le nombre des croix est proportionnel au taux de chaque acide.)

ACIDES AMINÉS.	Orobanche Hederae Duby.						Hedera Helix L.		
	Plante entière	10 JUILLET. PLANTE EN PLEINE VÉGÉTATION.					10 JUILLET.		
		Plante entière	Parties basales	Tiges.	Fleurs.	Graines.	Racines.	Tiges.	Feuilles.
Acide aspartique	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +
Acide glutamique	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +	++ +
Asparagine	+					+		+	
Glutamine	+				+	+	+	+	
Sérine	++ +	++ +	+	+	+	+	++ +	++ +	++ +
Glycocolle	++ +	++ +	++	++	++ +	++	++	++ +	++
Thréonine	+	+				+		+	+
Alanine	++ +	++ +	++	+	++ +	++	++ +	++ +	++ +
Tyrosine	++ +	++ +	++					+	+
Acide γ-amino-butyrique	++ +	++ +	++	++ +	++ +		++ +	++ +	++ +
Valine	++ +	++ +	++	++ +	++ +		++ +	++ +	++ +
Proline	++ +	++ +	++	++ +	++ +		++ +	++ +	++ +
Leucine	+	+		++	++		++	++	++
Arginine et bases hexoniques	+	++ +	++	++ +	++ +	++	++ +	++ +	++ +

acétonique à 0,2 p. 100, acidifiée par 1 p. 100 d'acide acétique ; NETIEN et LACHARME, 1956).

B. RÉSULTATS. — Le tableau XVI exprime les résultats obtenus. Si l'on considère l'Orobanche au début de son développement (13 juin,

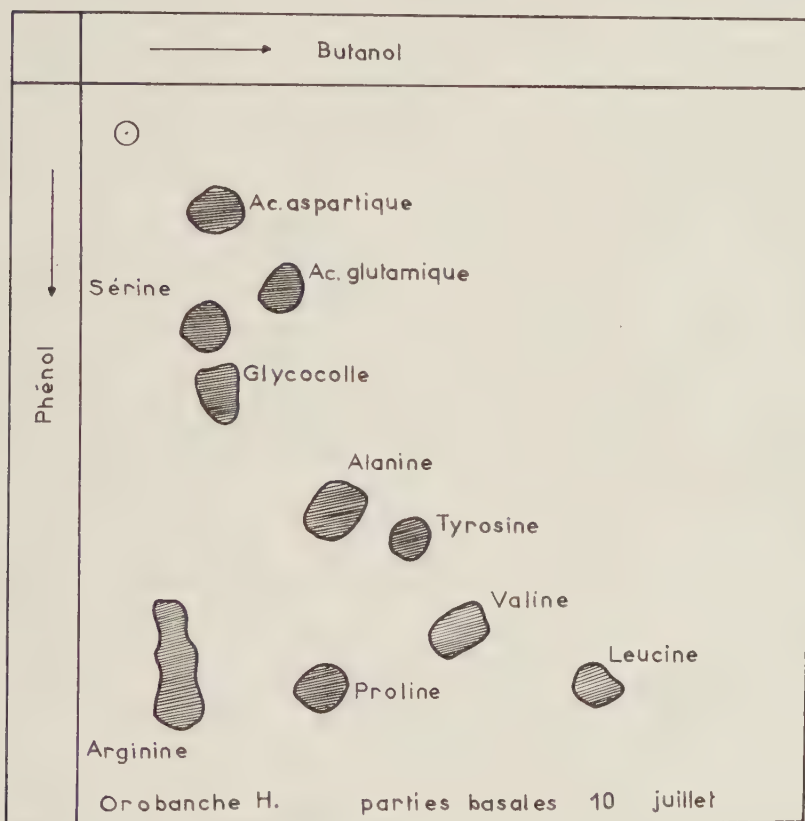


FIG. 57. — Chromatogramme des acides aminés libres contenus dans la partie basale d'*O. Hederae* au moment du plein épanouissement de la plante (10 juillet).

fleurs non épanouies) (cf. fig. 56), on remarque la présence d'une quantité considérable d'acides aminés, témoins de métabolismes azotés très importants. Les acides aspartique, glutamique et γ -amino-butyrique, la sérine, le glycocolle et l'alanine dominent dans ses divers tissus.

La valine, la proline et les bases hexoniques (arginine, lysine, histidine) sont en quantité non négligeable. La présence d'asparagine et de glutamine révèle certainement une protéogenèse intense.

Prise presque à la fin de son développement, au moment où les premières graines sont déjà mûres, certaines variations apparaissent dans la plante entière. Un certain nombre d'acides aminés se retrouvent sans chan-

gement. Par contre, le taux de sérine, glycolle, alanine et proline a diminué.

La disparition de l'asparagine et de la glutamine doit coïncider avec la fin des synthèses protidiques. Mais l'étude réalisée sur chaque organe se révèle plus intéressante que l'évaluation de ces divers composants dans l'ensemble des tissus de l'Orobanche.

On remarque toujours une grande stabilité des acides aspartique et glutamique, de la sérine, glycolle, alanine, valine, leucine et arginine.

L'asparagine et la glutamine n'apparaissent pas sur les chromatogrammes de la plante entière. Ils ne se retrouvent d'ailleurs pas dans les parties pondéralement les plus importantes (tiges et parties basales), mais se localisent dans les fleurs et surtout dans les graines, indice d'une protéogenèse encore active dans ces organes.

L'existence dans la partie basale de l'Orobanche, au moment de son activité maximale, d'un acide aminé aromatique, la tyrosine, est à souligner (cf. fig. 57). C'est à cette période et dans cet organe qu'on trouve les quantités les plus importantes de polyphénols.

La tyrosine peut, par sa structure phénolique, intervenir dans l'édification de ces substances. Il est permis de supposer que les acides caféique et chlorogénique pourraient donc avoir aussi une origine locale et être synthétisés directement dans l'Orobanche elle-même.

La présence des mêmes composés dans le Lierre serait-elle une coïncidence ?

Le problème est difficile à résoudre sans l'emploi de molécules marquées.

Nous pensons, toutefois, que les deux origines sont possibles. Le poids moléculaire de ces substances étant respectivement de 176 et 354, leur passage peut, très vraisemblablement, avoir lieu d'un organisme dans l'autre. Les résultats de GRIMMER indiquant la migration de substances d'un P. M. supérieur à 500, d'une plante-hôte (la Digitale) dans son parasite (la Cuscuta), confirment d'ailleurs cette hypothèse.

Mais quelle est l'origine de ces acides aminés ?

Le parasite en fait-il la synthèse lui-même à partir des glucides et des matières minérales azotées ? L'abondance d'alanine et de sérine sembleraient l'indiquer.

Ces substances, tout comme les hydrates de carbone, proviennent-elles aussi de l'hôte ?

Afin d'essayer de répondre à ces questions, nous avons effectué la recherche des amino-acides dans les divers organes du Lierre en contact étroit avec l'Orobanche déjà étudiée (10 juillet).

Les résultats, dans leur ensemble, montrent la présence des mêmes amino-acides déjà caractérisés dans l'Orobanche.

Les acides aspartique et glutamique, la sérine, le glycolle, la valine et la leucine sont ici aussi les plus abondants et les plus stables. Asparagine et glutamine, amides dont le rôle est capital dans le métabolisme intermédiaire, se localisent surtout dans la tige (cf. fig. 58).

La tyrosine, qui doit être en rapport avec la formation des acides poly-

phénoliques, se retrouve surtout dans les feuilles, lieu probable de sa synthèse.

Cet acide aromatique n'apparaît pas dans la racine de Lierre alors qu'on le trouve dans la partie basale de l'Orobanche, région où ces deux organes sont intimement unis.

La chromatographie exige néanmoins, pour révéler la présence d'un

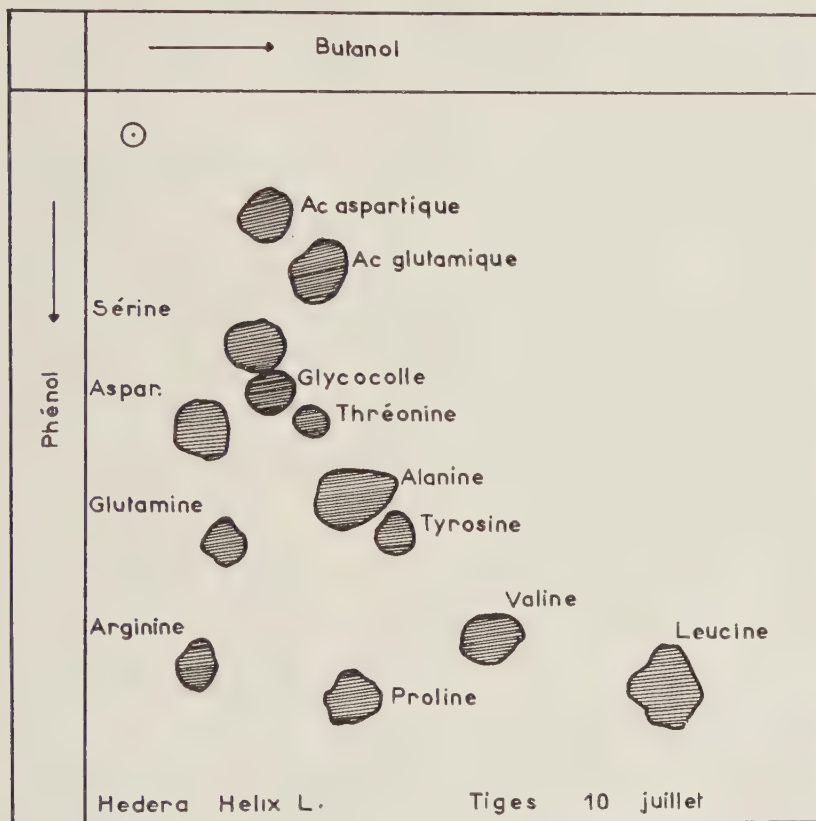


FIG. 58. — Chromatogramme des acides aminés libres contenus dans la tige du Lierre (récolté du 10 juillet).

composé, que celui-ci atteigne une certaine concentration dans les tissus de la plante. Il est donc possible que la tyrosine existe aussi dans cet organe, mais à un taux trop faible pour pouvoir être caractérisée.

3^e Conclusions. — Comment peut-on, à travers ces résultats, se représenter le chimisme azoté de l'Orobanche ?

Toutes les formes d'azote s'y trouvent. L'azote minéral existe aussi en quantité non négligeable. Il doit tirer son origine de la plante-hôte, les racines du parasite ne paraissant pas fonctionnelles.

La croissance très rapide de la hampe florale ne permet pas de mettre en

évidence des variations particulières d'une forme ou d'une autre : les différentes synthèses protidiques paraissent relativement équilibrées. Il semble qu'il doive y avoir un apport continu de substances azotées depuis le Lierre, pour maintenir, dans l'Orobanche, une concentration aussi uniforme.

Les résultats obtenus de l'étude organe par organe indiquent une protéogenèse très active dans les fleurs et surtout dans les graines, exactement comme dans une plante autotrophe.

Les divers tissus du parasite sont donc le siège d'actions énergétiques, phytochimiques et fermentaires importantes.

La caractérisation des acides aminés révèle la présence à peu près constante des mêmes composés dans les végétaux, qu'ils soient ou non privés de chlorophylle. L'abondance de ces divers éléments au début du développement de la plante, prouve une protéosynthèse et une respiration très active, qui se localise, par la suite, au niveau des fleurs et des graines.

Les mêmes substances se retrouvent dans le Lierre. Il est très vraisemblable de penser que les acides aminés de l'Orobanche tirent leur origine de la plante-hôte. Ces composés se déplacent facilement de cellule à cellule et doivent pénétrer dans le parasite d'une façon identique aux hydrates de carbone, dont l'apport étranger est, dans ce cas, une nécessité pour la plante privée de chlorophylle.

Il n'est pas impossible cependant que l'Orobanche effectue, dans certains cas, la synthèse d'acides aminés à partir des glucides dont elle est très pourvue et de l'azote minéral.

Tout comme dans un fruit ou un jeune rameau secondaire, une partie des acides aminés viendrait de la plante mère, et une autre serait peut-être synthétisée par le parasite lui-même.

L'ensemble des études, aussi bien anatomiques que biochimiques, entreprises jusqu'à présent sur l'Orobanche du Lierre, confirment l'hypothèse selon laquelle ce parasite se comporte comme un bourgeon greffé naturellement sur le Lierre.

La jonction réalisée, et les raccordements vasculaires établis, de la plante-hôte au « greffon-Orobanche » passeraient tous les éléments dialysables : substances minérales, sucres solubles (saccharose, glucose et fructose), acides aminés, et même certains composés de poids moléculaire relativement élevé, comme les acides caféiques et chlorogénique ; néanmoins, en dehors des glucides et des ions minéraux, le parasite semble pouvoir effectuer toutes les autres synthèses. A l'intérieur de la plante, l'absence de chlorophylle rend essentiel l'apport glucidique étranger. Toutefois, les relations étroites entre les deux partenaires doivent permettre l'échange de bien d'autres substances qui, *a priori*, ne paraissent pas indispensables à ses métabolismes, mais que le parasite utilise comme doit le faire tout organe privé de photosynthèse sur un végétal chlorophyllien.

CHAPITRE III

ESSAIS DE CULTURE *IN VITRO* DE L'OROBANCHE DU LIERRE

Dans le premier chapitre de ce travail, nous avons précisé les conditions germinatives des graines d'Orobanche et étudié d'une façon attentive les processus de fixation du parasite sur la racine hôte.

Dans le deuxième chapitre, nous avons entrepris l'étude biochimique de cette plante hétérotrophe.

L'Orobanche emprunte à son hôte les sucres solubles les plus simples (saccharose, glucose et fructose) qui suffisent à ses métabolismes hydrocarbonés ; elle possède les mêmes acides aminés que ceux contenus dans le Lierre ; ceux-ci peuvent très facilement passer d'une plante dans l'autre, mais il n'est pas impossible que le parasite en fasse aussi la synthèse, de même que pour les substances polyphénoliques.

Nous avons vu, d'autre part, que les plastes de l'Orobanche, qui auraient régressé sous l'influence d'un « greffage accidentel » rendant inutile leur fonction chlorophyllienne, ont conservé leurs pigments caroténoïdiques et ont même développé la faculté de polymériser de l'amidon.

Il était donc très tentant d'essayer de cultiver cette plante hétérotrophe en dehors de son hôte ou tout au moins dans des conditions nettement définies.

L'étude biochimique réalisée nous avait d'ailleurs donné les éléments nécessaires pour établir les milieux synthétiques, aussi proches que possible des milieux naturels sur lesquels végète le parasite.

Ainsi pourraient être réellement précisées les modalités d'infection, les conditions de développement et les exigences nutritives de l'Orobanche du Lierre.

Il était aussi intéressant de savoir si, par un apport artificiel supplémentaire, il n'était pas possible de « réveiller » en quelque sorte la synthèse de la chlorophylle et de réadapter ce végétal à la vie autotrophe, vie qu'il possédait très vraisemblablement jadis.

Les Orobanches sont néanmoins dans la nature toutes des parasites stricts et obligatoires, en ce sens qu'elles sont étroitement associées aux hôtes qu'elles parasitent. On ne peut les en séparer, ni les faire croître et se reproduire en dehors de la plante sur lesquelles elles sont fixées.

Nous avons donc essayé tout d'abord, comme l'avait fait MOREL (1948) pour le Mildiou et l'Oïdium de la vigne, de cultiver *in vitro* la plante-hôte, le Lierre, et d'implanter ensuite sur ses tissus en prolifération des graines d'Orobanche en germination.

Puis, c'est en dehors de la plante-hôte, sur des milieux de culture définis, que nous avons entrepris de faire vivre ce parasite en partant soit de graines, soit de fragments de tissus.

Aucun essai, à notre connaissance, n'avait été tenté jusqu'à ce jour avec les Orobanches.

GAUTIER, en 1908, avait essayé, « mais vainement, de nourrir de jeunes plantules (de *Melampyrum*) avec des solutions nutritives de nature diverse, indépendamment de toutes plantes hospitalières » (*loc. cit.*, p. 77).

Les seules données que nous ayons sur la culture *in vitro* de plantes parasites ne se rapportent qu'à la Cuscuta.

Dès 1894, PIERCE avait réussi à faire vivre pendant quelques jours des plantules de Cuscuta, mais sans obtenir de survie au-delà.

MIRANDE, en 1901, reprenait ces expériences sur hôte artificiel mais déclarait : « Je les ai tentées pendant longtemps sans succès » (*loc. cit.*, p. 47).

C'est à Loo que revient, en 1945, le grand mérite de maintenir vivants sur un substrat comprenant du saccharose, des extraits de levure et des sels minéraux, des fragments de tiges de *Cuscuta campestris*. Pendant près de cinq mois, ces fragments se sont développés et, fait exceptionnel, une fleur s'est ainsi épanouie *in vitro*.

Tout récemment enfin, en 1957, BERTOSSI annonçait de son côté la culture, sur milieu défini, de *Cuscuta Epithymum*.

1^o Essais de culture de l'Orobanche sur des tissus de Lierre cultivés « in vitro ». — Pour ces tentatives de culture de parasite obligatoire, le problème était double.

Il fallait d'abord cultiver les tissus de l'espèce infestée par le parasite, puis réaliser la fixation de l'Orobanche.

Nous nous sommes donc efforcé dans un premier temps de cultiver *in vitro* les tissus de Lierre.

A. CULTURE « IN VITRO » DES TISSUS DE LIERRE. — Pour entreprendre cette culture, nous nous sommes adressés à des fragments de tiges récoltés sur des rameaux en pleine végétation. Après écorçage et stérilisation, nous les avons implantés dans des milieux nutritifs gélosés, suivant la technique maintenant classique de GAUTHERET (1942) et appliquée par MOREL (1945 et 1948) aux espèces ligneuses.

Il a fallu tout d'abord préciser les besoins nutritifs de cette espèce en essayant un nombre considérable de milieux de culture, faisant varier qualitativement et quantitativement les éléments minéraux, vitaminiques et hormonaux (PRIVAT, 1959).

Les milieux étaient répartis en tubes gélosés à 1,2 p. 100 et les fragments orientés en position inverse de celle qu'ils avaient sur la plante. Les cultures étaient conservées à la lumière diffuse, à une température de $23^{\circ} \pm 1^{\circ}$.

Des essais préliminaires nous avaient enseigné que seule une concentration élevée en hétéro-auxine était capable de déclencher la multiplication

cellulaire des explantats. La concentration d'acide 3-indol-acétique (A. I. A.) agissant le plus favorablement sur cette stimulation était de l'ordre de 10^{-6} .

La solution de KNOP diluée au demi, enrichie en chlorure de potassium, a donné, avec la solution de HELLER, les meilleurs résultats.

Comme l'a montré CAMUS (1954), la pénicilline *G* peut, employée seule

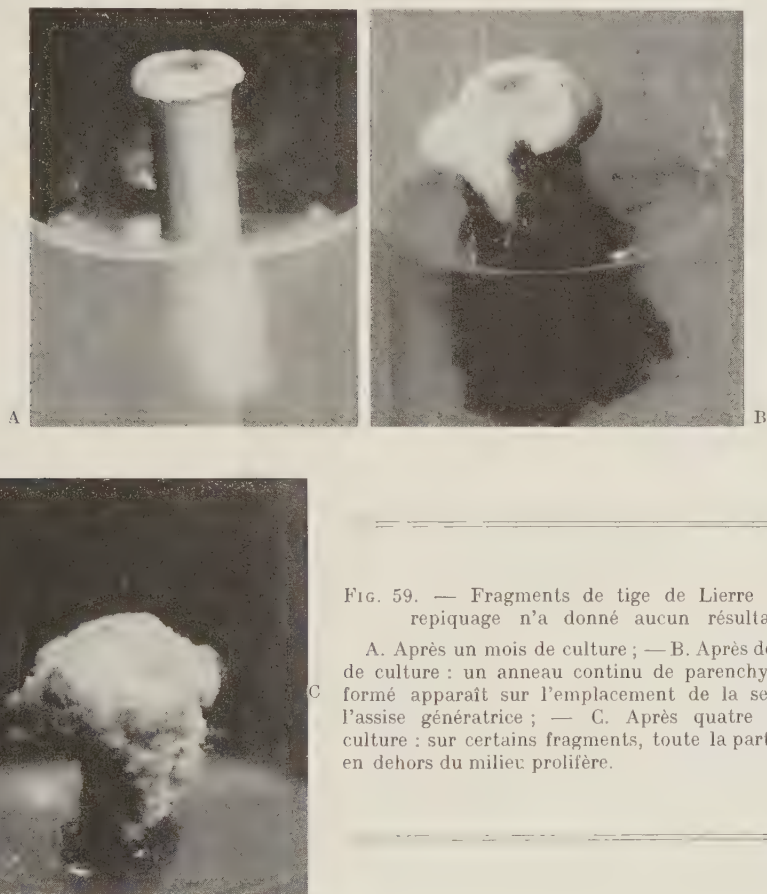


FIG. 59. — Fragments de tige de Lierre dont le repiquage n'a donné aucun résultat.

A. Après un mois de culture ; — B. Après deux mois de culture : un anneau continu de parenchyme néoformé apparaît sur l'emplacement de la section de l'assise génératrice ; — C. Après quatre mois de culture : sur certains fragments, toute la partie située en dehors du milieu prolifère.

comme substance excitoformatrice, provoquer la prolifération de certains tissus incapables de synthétiser par eux-mêmes les substances de croissance nécessaires. Mais, sur l'espèce qui nous préoccupe et dans nos conditions expérimentales, elle n'a pas eu d'activité.

En 1955, MILLER et ses collaborateurs découvraient un dérivé de la purine, la 6-furfuryl-amino-purine ou kinétine, dont l'action se montrait essentielle pour la division des cellules végétales. Nous l'avons introduite dans nos milieux à différentes concentrations. Elle ne s'est pas révélée plus efficace que l'hydrolysate de caséine, le lait de Coco et les différentes

vitamines utilisées (acide folique, biotine, et ensemble de vitamines du groupe B (1).

Dans les meilleures conditions, au bout d'une quinzaine de jours, un anneau continu de parenchyme néoformé apparaît sur l'emplacement de la section de l'assise génératrice. Cet anneau s'épaissit et, quelquefois, déborde de chaque côté pour former un cal. (Fig. 59 A et B).

Dans certains cas, comme l'avait observé MOREL (1945), toute la partie du fragment située en dehors se couvre uniformément d'un tissu blanc très fin qui s'épanouit jusqu'à atteindre 4 à 5 mm (fig. 59 C).

Malgré tout le soin apporté à ce que le scalpel ne lèse pas trop les tissus, nous n'avons jamais réussi, tout comme Morel (1948), à obtenir une culture indéfinie par repiquages successifs. Tous les cals cessent de se développer dès leur transplantation sur un nouveau milieu.

Les prélèvements de Lierre faits à des époques différentes de l'année, sur des rameaux florifères ou stériles, n'ont pas donné de meilleurs résultats.

Lorsqu'on considère la diversité des tissus végétaux, on conçoit que leurs exigences nutritives soient différentes.

Néanmoins, l'ensemble considérable de substances mises en œuvre aurait dû, semble-t-il, permettre la survie de ces tissus.

La culture *in vitro* des tissus de Lierre doit relever d'un problème plus physiologique que nutritif : ses organes sont probablement trop différenciés, pour pouvoir proliférer indéfiniment.

Aussi, nous nous sommes adressés, par la suite, à des tissus de Lierre moins différenciés, en l'espèce l'axe hypocotylé issu directement de la graine.

Pour cela, on stérilise des baies de Lierre pendant une heure dans une solution fraîchement préparée d'hypochlorite de calcium à 120 g par litre ; puis on extrait les graines en pressant le fruit dans une boîte de Pétri stérile. En fendant très légèrement le testa avec un scalpel, on arrive à obtenir des germinations très rapides en moins de vingt-quatre heures ; ainsi, en accord avec BOULLARD (1954), le champignon endophyte, constamment présent dans les racines d'*Hedera Helix*, n'est-il pas nécessaire à la germination.

Ces graines sont ensuite déposées dans un tube à la surface d'un milieu de culture gélosé.

Au bout d'une vingtaine de jours, on repique sur un nouveau milieu une section de 1 cm de l'axe hypocotylé.

La partie de l'axe hors de la gélose prolifère d'une manière assez importante pour que le cal puisse, par la suite, être repiqué. Cette prolifération est assez satisfaisante, quoique lente, puisque nous en sommes, dans la plupart de nos cultures, au septième ou au huitième repiquage de souches âgées de plus de seize mois.

(1) Vitamines du groupe B utilisées :

Pantothénate de calcium.....	8-10 ⁻⁷	Acide nicotinique	5-10 ⁻⁷
Thiamine	10 ⁻⁷	Inositol	5-10 ⁻⁷
Riboflavine	5-10 ⁻⁷	Chl. de choline.....	10 ⁻⁷
Pyridoxine	10 ⁻⁷		

Le milieu qui nous a donné les meilleurs résultats a la composition suivante : milieu de base : solution minérale de HELLER, solution de biocatalyseurs de HELLER (1), saccharose : 5 g p. 100 ; pantothénate de calcium : 10^{-6} ; biotine : 10^{-8} ; pyridoxine : 10^{-6} ; inositol : 10^{-4} ; acide nicotinique : 10^{-6} .

Comme hétéro-auxine, nous avons employé l'acide 1-naphtalène-acétique (A. N. A.) qui a l'avantage d'être plus stable à la lumière et dont l'action à haute dose est moins désorganissante [sur les tissus en prolifération. La meilleure concentration est de l'ordre de 10^{-6} ; à 10^{-7} , la prolifération

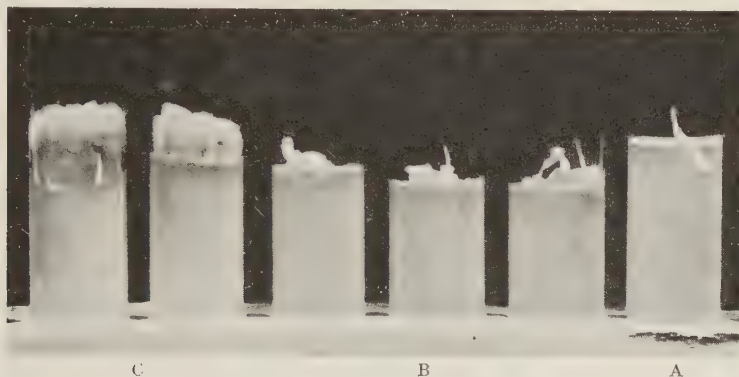


FIG. 60. — Culture de Lierre (*Hedera Helix* L.).

A. Fragment d'axe hypocotylé une semaine après la mise en culture ; — B. Les mêmes fragments, deux mois après. La partie de l'axe au contact de la gélose a proliféré suffisamment pour permettre avec succès un premier repiquage de ces tissus ; — C. Colonies de Lierre âgées de quatre mois, provenant d'une souche âgée de treize mois (5^e repiquage).

est assez faible, mais, à des concentrations de l'ordre de 10^{-5} , les tissus deviennent friables et difficiles à repiquer.

Les souches de Lierre ainsi isolées se présentent comme des masses cellulaires plus ou moins compactes, mamelonnées, blanchâtres ou légèrement brunâtres (fig. 60).

Les coupes pratiquées dans les tissus d'une souche âgée de douze mois, après le cinquième repiquage dans des milieux contenant l'acide 1-naphtalène-acétique à la concentration de 10^{-6} , présentent un tissu homogène composé de cellules parenchymateuses identiques sans formations vasculaires. Dans ce parenchyme, les cellules légèrement hypertrophiées se multiplient par recloisonnement, sans formation de cristaux d'oxalate de calcium ni de canal sécréteur.

À des concentrations en hétéro-auxine de l'ordre de 10^{-5} , on assiste à une hypertrophie importante des cellules qui ont tendance à se dissocier.

(1) Solution de biocatalyseurs de HELLER.

FeCl ₃ , 6 H ₂ O	1 mg/l	CuSO ₄ , 5 H ₂ O.....	0,03 mg/l
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	1 —	AlCl ₃	0,03 —
BO ₃ H ₃	1 —	NiCl ₂ , 6 H ₂ O.....	0,03 —
MnSO ₄ , 4 H ₂ O	0,1 —	KI	0,01 —

Ces tissus ont le même aspect que ceux de *Pharthenocissus tricuspidata* cultivés par GAUTHERET (1955) sur des milieux additionnés de doses croissantes d'auxine.

Ces tissus dissociés montrent, ici aussi, deux types bien distincts de cellules : certaines de forme ovoïde, de 100 à 200 μ de long sur 100 à 150 μ de large et d'autres, presque aussi fréquentes, de forme allongée, mesurant plus de 600 μ de long sur 50 à 100 μ de large (cf. fig. 61).

Toutefois, dans nos cultures d'*Hedera Helix*, ce phénomène d'hypertro-

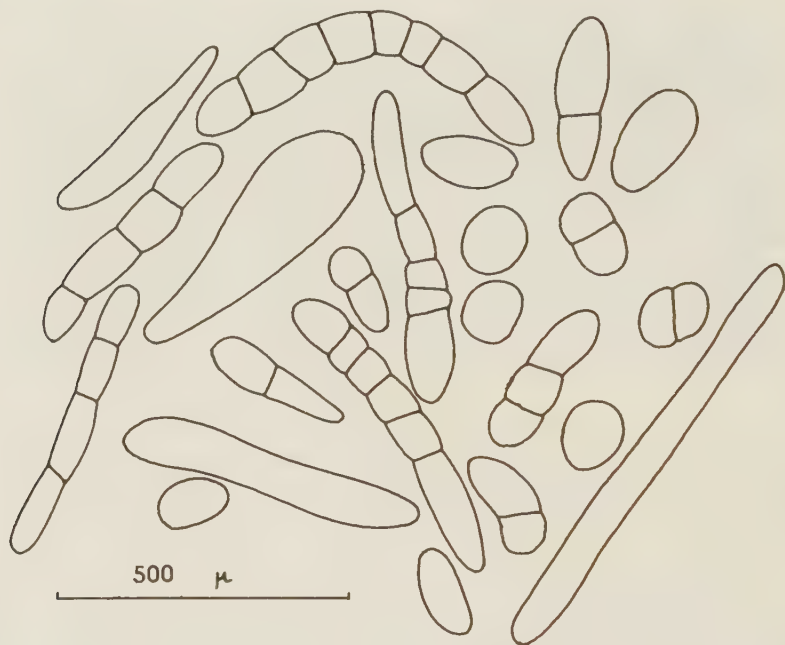


FIG. 61. — Cellules de culture de tissus de Lierre, cultivées en présence d'acide 1-naphtalène acétique à la concentration de 10^{-5} . Ces cellules hypertrophiées et de forme arrondie se divisent activement, puis se détachent les unes des autres.

phie cellulaire et de dissociation, correspondant à la transformation hyperhydrique des processus cicatriciels, s'accompagne de divisions cellulaires.

B. ESSAIS DE FIXATION DE L'OROBANCHE SUR LES TISSUS DE LIERRE. — Des graines d'Orobanche, stérilisées à l'hypochlorite suivant la technique citée précédemment, étaient mises à germer au contact de racicules de Lierre en boîte de Pétri et dans des conditions aseptiques.

La germination une fois obtenue, ces graines étaient prélevées avec une anse de platine flambée et déposées au contact de la masse cellulaire en prolifération.

Malgré le très grand nombre d'essais ainsi effectués, jamais nous n'avons observé le développement ni la fixation de l'Orobanche. La plupart du

temps, malgré les précautions prises, toutes nos cultures étaient infectées de souillures diverses.

L'insuccès de ces tentatives tient, tout d'abord, en grande partie, à la difficulté que l'on a de stériliser soigneusement les graines d'Orobanche. Il faut multiplier considérablement les manipulations pour obtenir un certain nombre de graines viables dans des conditions aseptiques.

D'autre part, nous avons pensé que, dans le sol, les racines du Lierre excrétaient, comme nous l'avons vu, un certain nombre d'acides et notamment des acides aminés, ces substances étaient indispensables au développement du filament germinatif du parasite avant qu'il n'atteigne les cellules de l'hôte.

Dans ce but, nous avons, avant d'ensemencer les cultures de Lierre, mis les graines en germination avec des solutions de glycolle, d'alanine et d'acides glutamique et aspartique. Mais les résultats furent également négatifs.

Les tissus ainsi cultivés *in vitro* ne doivent certainement pas avoir le même chimisme que la plante dans ses conditions naturelles.

Les expériences d'inoculation de divers tissus de Muflier cultivés *in vitro* par des urédospores de *Puccinia Antirrhini*, se révèlent constamment négatives. Par contre, elles réussissent sur des fragments de tiges intacts, ce qui laisse supposer que l'épiderme joue un rôle dans ces processus d'infestation (ROSETTI et MOREL, 1958).

Il est possible aussi que la pénétration de l'extrémité du filament germinatif de l'Orobanche ne puisse avoir lieu que sur des racines de Lierre infectées par le champignon endophyte qui les parasite normalement.

D'intéressantes recherches pourraient être effectuées pour savoir si, comme dans le cas d'*Orchis militaris* qui répond à l'infection de *Rhizoctonia repens* en produisant un cryptophénol (GAUMANN, 1959), le Lierre ne produirait pas semblablement une substance pouvant être par la suite, directement ou indirectement, favorable à l'implantation de l'Orobanche.

Le Lierre pose là un problème d'hyperparasitisme qui pourrait être la source de nouveaux travaux.

Ces essais infructueux n'indiquent pas toutefois que la culture *in vitro* de l'Orobanche sur les tissus de son hôte soit impossible. Mais les conditions naturelles étant tellement difficiles à reproduire, des tentatives très nombreuses seront nécessaires avant de réussir.

C'est pourquoi nous avons préféré tenter de cultiver directement ce parasite sur un milieu de culture défini.

2^o Essais de culture de l'Orobanche du Lierre en dehors de son hôte, sur des milieux définis. — A. ESSAIS DE CULTURE « IN VITRO » DES GRAINES D'« OROBANCHE HEDERÆ ». — Au cours de l'étude sur la germination de cette espèce, nous avons souvent fait appel aux techniques utilisées pour cultiver les Orchidées.

La taille, l'aspect et, en partie, la biologie de leurs graines les rapprochent, en effet, des Orobanches.

Nous avons pareillement repris les méthodes de culture *in vitro* de la Vanille, mises au point par BOURIQUET (1954).

Les graines étaient stérilisées, puis mises en germination et repiquées sur des milieux nutritifs gélosés en tubes inclinés. Nous avons fait varier la composition minérale de ces milieux (HELLER, KNOP, KNOP 1/2, etc.), les sucres (saccharose, fructose, glucose) et leur concentration (de 4 à 20 p. 100).

Un grand nombre de vitamines (vit. C, B₁, B₂, B₆, Biotine, acide nicotinique, pantothénate de calcium) et de substances de croissance (acide indol-acétique, acide 1-naphtalène acétique) y fut incorporé, mais sans résultat.

Voulant nous rapprocher le plus possible des conditions naturelles, nous avons introduit dans nos milieux des extraits de terre (prélevés au niveau de l'implantation des Orobanches) et des extraits de racines de Lierre.

Aucune culture ne s'est jamais développée, si ce n'est une nombreuse microflore dont il a toujours été difficile de se débarrasser.

Les graines d'Orobanche, mises directement en contact de ces divers milieux, n'ont pas d'ailleurs réussi à germer.

Aussi, c'est finalement vers la culture des tissus du parasite sur des milieux définis que nous nous sommes tournés.

B. ESSAIS DE CULTURE « IN VITRO » DES TISSUS DE L'OROBANCHE DU LIERRE. — Les essais ont toujours été effectués en tubes de gélose contenant des milieux de composition variée, suivant la technique de GAUTHERET (1942).

L'Orobanche, dès la récolte, est immédiatement amenée au laboratoire, débarrassée soigneusement de la terre qui la souille, puis immergée pendant quinze minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium à 110 g par litre. Après ce contact, la plante est grattée, dépouillée de ses écailles dans une pièce stérile et à nouveau mise en contact dix minutes dans une solution identique d'hypochlorite. Enfin, après lavage à l'eau stérile, la tige d'Orobanche est découpée au scalpel, sous deux feuilles de papier filtre stérile, en petits fragments de 1 cm de haut qui sont implantés sur la gélose.

Nous avons repris dans ces essais la plupart des milieux ayant servi dans la culture du Lierre, en y incorporant les substances dont l'analyse avait révélé la présence dans les tissus de la plante-hôte (saccharose, fructose, glucose pour les sucres et tous les acides aminés caractérisés dans la racine du Lierre).

Mais, dès les premières heures de la mise en culture, les tissus de l'Orobanche noircissent très rapidement et laissent exsuder dans la gélose une substance brun foncé. Cette substance présentant tous les caractères des orthodiphénols (bleu avec le réactif de BARTON, jaune avec les alcalins, brun rouge avec le réactif d'HÆPFNER), doit être, très vraisemblablement, l'acide chlorogénique, très abondant dans la zone corticale de l'Orobanche. Aucune prolifération cellulaire ne se manifeste.

La solution de ce problème doit se trouver dans le prélèvement des tissus en évitant l'oxydation et le brunissement de la plante ; la composition du milieu de culture n'intervient, à l'origine, que fort peu.

Nous avons donc essayé de bloquer les polyphénoloxydases en immergeant les fragments sectionnés dans des solutions de cyanure de potassium ou de thio-urée, mais sans plus de résultats.

Nous avons aussi recherché dans l'Orobanche si certains tissus avaient pu conserver, plus que d'autres, la possibilité de proliférer. Dans cet esprit, les points végétatifs de l'extrémité de la tige ont été mis en culture suivant la technique de MOREL et MARTIN (1955), ainsi d'ailleurs que des fragments de très jeunes tubercules prélevés dans le sol. Mais tous ces essais ont été négatifs.

Les tissus riches en tanin, donc en substances polyphénoliques, se cultivent souvent très difficilement.

JACQUIOT avait, en 1947, constaté l'effet inhibiteur de ces composés sur le développement *in vitro* du cambium de certains arbres forestiers. « On peut penser que ces tanins, où les produits de leur oxydation, diffusant dans le milieu, puis réabsorbés avec l'eau par les tissus, exercent sur eux une action toxique, ou tout au moins inhibitrice » (*loc. cit.*, p. 434). Il avait eu l'idée d'abaisser la teneur en tanin du milieu environnant la culture, par des repiquages fréquents durant les premiers jours de l'implantation, ou d'insolubiliser ces tanins au moyen de solutions de caféine.

BALL, par la suite, réussissait, en 1950, à cultiver des tissus de *Sequoia sempervirens* par cette méthode.

Nous avons donc pareillement, après stérilisation de la hampe florale d'une Orobanche, immergé son sommet sans « l'écorcer », dans une solution de 0,5 p. 100 de caféine pendant cinq minutes. Implantés dans le milieu de culture, ces fragments portant des fleurs ont très peu bruni et, fait intéressant, certaines fleurs se sont en partie épanouies. Mais deux jours après, la culture avait péri.

Nous avons donc poursuivi nos essais en employant toujours des solutions de caféine, soit en macération préalable, soit en incorporant directement ce produit aux milieux de culture à la dose de 0,2 p. 100 par litre. Parmi le nombre très considérable de manipulations effectuées, il a été possible de voir enfin se développer, hors de la plante hôte, des fragments de tissus d'Orobanche.

Ce résultat a été obtenu à partir d'une Orobanche d'une forme peu habituelle pour l'espèce.

Cet individu, haut de 30 cm, présentait à son sommet une épaisseur de près de 2 cm et un tout petit nombre de fleurs épanouies seulement.

Après l'avoir immergée pendant un temps assez court (cinq minutes) dans la solution d'hypochlorite, nous avons découpé avec un trocart à ponction d'ascite, dans son extrémité et dans sa base, des fragments cylindriques de 5 mm de diamètre sur 1,5 cm de long. La séparation des fragments était effectuée dans une boîte de Pétri contenant une solution à 0,2 p. 100 de caféine stérilisée.

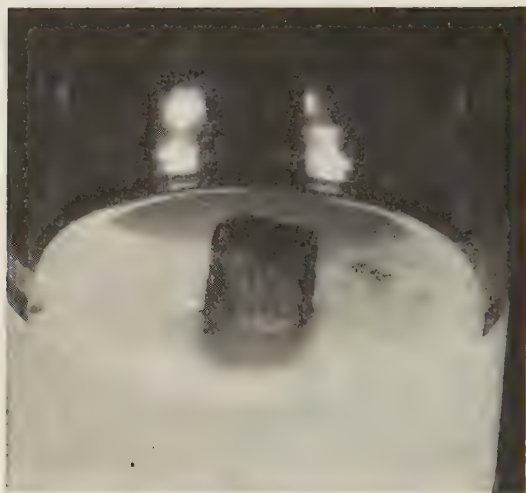


FIG. 62.



FIG. 63.

FIG. 62. — Fragments de tissu prélevé au moyen d'un trocart dans la partie basale de l'Orobanche du Lierre. L'explantat a bruni sans se développer.

FIG. 63. — Fragment de tissu prélevé au moyen d'un trocart dans l'extrémité de la hampe florale de l'Orobanche du Lierre. Les tissus en contact avec le métal se sont nécrosés, les autres ont proliféré. Un épiderme avec de très nombreux poils à tête sécrétrice s'est formé (culture âgée de vingt-cinq jours).

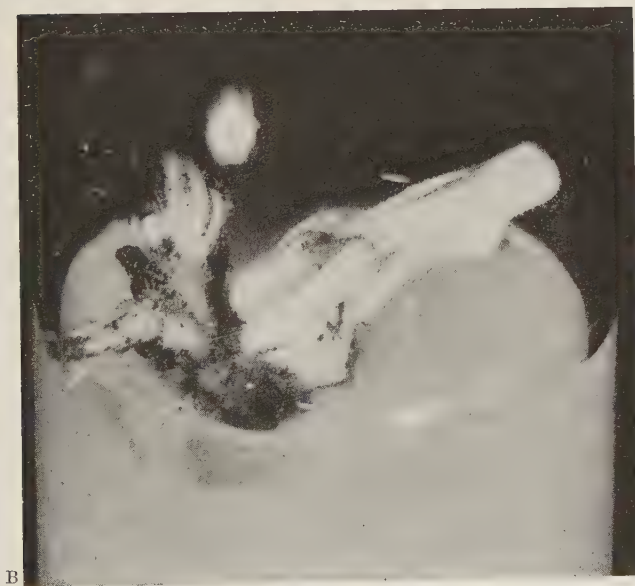
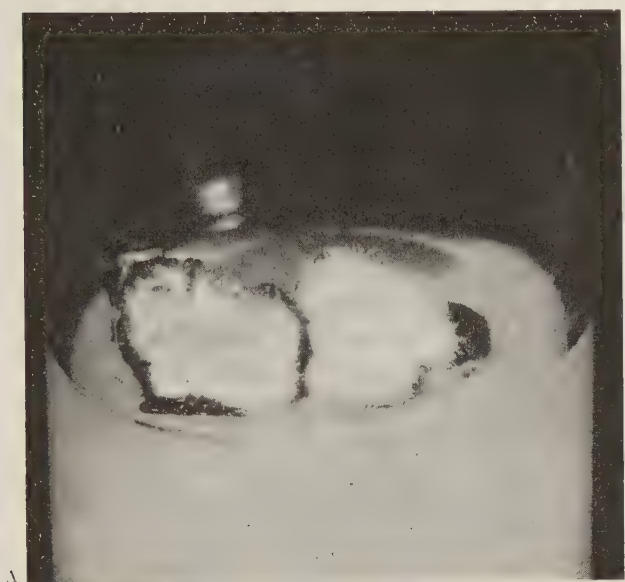


FIG. 64. — A et B. Fragments de tissus prélevés au moyen d'un trocart dans l'extrémité de la hampe florale de l'Orobanche du Lievre. Les tissus en contact avec le métal se sont nécrosés. Les autres ont proliféré. Un épiderme avec de très nombreux poils à tête sécrétrice s'est formé. Une fleur s'est en partie épanouie. Ces explantats avaient à l'origine la même forme et la même taille que le fragment de la figure 62 (cultures âgées de vingt-cinq jours).

Ces explantats ont été déposés sur le milieu de culture suivant : solution minérale de HELLER avec ses oligoéléments, saccharose 5 p. 100, acide nicotinique 10^{-6} , pantothénate de calcium 10^{-6} , inositol 10^{-6} , biotine 10^{-8} et comme substance de croissance, l'acide 1-naphtalène-acétique à la concentration de 10^{-5} .

Les cultures étaient placées en lumière diffuse, à une température de $23 \pm 2^\circ$, les tubes étant bouchés au papier d'étain.

Un premier point important est à signaler : aucune substance polyphénolique n'a diffusé dans le milieu.

Les fragments prélevés à la partie basale de l'Orobanche ont bruni lentement, sans présenter aucune prolifération (fig. 62).

Par contre, ceux prélevés à l'extrémité de la hampe florale se sont tous, en partie, développés.

Chez certains, ce développement n'a intéressé que la partie corticale et des lambeaux de sépales (fig. 63).

Chez d'autres, c'est la base du calice d'une fleur qui a proliféré.

Et enfin, dans un explantat, une fleur s'est presque complètement épanouie (fig. 64).

Dans tous ces cas, seules les parties directement au contact de l'acier du trocart ont bruni et se sont nécrosées. Toutes les autres se sont revêtues d'un épiderme présentant de très nombreux poils pluricellulaires à tête sécrétrice, formant un feutrage dense à la surface des explantats.

Les fleurs qui se sont développées étaient incolores.

Ces cultures sont restées ainsi à proliférer du 10 juin, date de leur implantation, jusqu'au 5 juillet. A ce moment, dans un des tubes, une fleur s'écrasant en partie sur les parois du verre (fig. 64), nous avons décidé d'effectuer le repiquage de tous les fragments.

Après l'avoir débarrassée des parties nécrosées, chaque culture fut réimplantée dans de nouveaux milieux. Une semaine après, elles brunissaient et tout développement s'arrêtait.

Nous avons essayé un très grand nombre de fois de répéter cet essai, mais sans jamais y parvenir.

Nous pensons que cette unique réussite doit être due à plusieurs causes :

Elle a dépendu tout d'abord de l'épaisseur exceptionnelle du sommet de la hampe florale sur laquelle ont été prélevés nos explantats.

Cette épaisseur nous a permis de stériliser moins longtemps les tissus (cinq minutes au lieu de quinze), donc de moins les léser. Le trocart, d'un diamètre de 5 mm, a directement prélevé la partie vitale de ce sommet, avec les points végétatifs des bourgeons floraux, en rejetant la zone corticale et les bractées.

D'autre part, cette Orobanche, malgré sa taille considérable, n'avait aucune fleur épanouie ; toutes étaient à l'état d'ébauche à l'abri des bractées très denses et très serrées. Ce retard de développement a certainement influé sur la prolifération des cultures.

Enfin, la caféine a dû contribuer à insolubiliser l'acide chlorogénique responsable de la diffusion de matières brunes dans la gélose. Mais normale-

ment, malgré l'emploi de cet alcaloïde, un léger noircissement s'opère toujours, ce qui n'était pas le cas dans ces essais. Cette Orobanche devait contenir dans ses tissus une quantité de substances polyphénoliques insuffisante pour inhiber les cultures.

3^o Conclusions. — L'Orobanche du Lierre est une des rares espèces de cette famille à parasiter d'une façon presque exclusive un seul hôte. Elle exige certainement des conditions très particulières et très strictes pour se développer.

On pouvait donc penser, *a priori*, que sa culture *in vitro* ne devait être possible que sur des tissus de Lierre.

Nous avons réussi, après bien des difficultés, à obtenir la culture de cette espèce, mais l'infestation par les germes d'Orobanche s'est toujours soldée par un échec.

Les racines de Lierre doivent très vraisemblablement excréter dans le sol certaines substances favorisant la pénétration des cellules de l'extrémité du filament germinatif de l'Orobanche dans les tissus de l'hôte. Il est possible que ces substances fassent défaut dans les tissus cultivés *in vitro*, ce qui expliquerait l'échec de ces tentatives.

Nous pensons que la solution de cet important problème doit se trouver dans la culture des tissus de l'Orobanche directement sur un milieu de composition définie.

Il nous a été donné d'obtenir le développement, pendant près de vingt-cinq jours, de fragments d'extrémité de tiges d'*O. Hederæ*. Sur ces fragments, des bourgeons floraux se sont épanouis et un épiderme s'est formé, revêtu de très nombreux poils à tête sécrétrice.

Malheureusement, ces cultures ont péri au premier repiquage.

Les tissus de ce parasite, surtout dans les zones corticales, contiennent une quantité considérable de substances polyphénoliques dont l'oxydation, lors de l'implantation, inhibe la culture.

Il faut donc soit empêcher cette oxydation par des antioxydases, soit bloquer les polyphénols en les insolubilisant.

Mais il serait plus aisé, nous semble-t-il, de s'adresser à des Orobanches moins riches en tannoïdes.

Les tissus de *Phelypæa arenaria* brunissent beaucoup moins facilement au contact de l'air.

C'est dans l'étude de cette espèce qu'ultérieurement nous orienterons nos efforts.

La réussite complète de la culture des tissus de ce parasite permettrait de préciser avec certitude ses conditions de développement et ses exigences nutritives, mais surtout autoriserait les plus grands espoirs sur les essais de réadaptation de cette plante à la vie autotrophe.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Des recherches biologiques effectuées sur une Orobanche pouvaient paraître à l'origine peu justifiées.

Le nombre considérable de publications ayant paru depuis sur le parasitisme semblaient en avoir épuisé tout l'intérêt. Mais les observations que nous avons faites incidemment sur certains points ne correspondaient pas à celles des auteurs précédents.

Ainsi, cette étude, envisagée à l'origine sur un point particulier, s'est-elle élargie.

Nous avons voulu, en nous localisant à une seule espèce, l'Orobanche du Lievre, préciser à la lumière des méthodes et des acquisitions scientifiques récentes la conception du parasitisme lui-même chez ces phanérogames vouées exclusivement à l'exploitation d'un hôte.

De l'ensemble de notre travail se dégage une interprétation nouvelle des faits beaucoup plus physiologique, mais que, pour le moment, nous appliquerons strictement à l'espèce qui nous préoccupe.

« L'état parasitaire n'est pas une entité immuable répondant à une condition précise » (P.-P. GRASSE, 1935). Et il serait hasardeux d'étendre trop hâtivement nos conclusions à l'ensemble des phanérogames parasites.

Ayant fait suivre chaque partie de cette étude de conclusions particulières, nous allons seulement faire ressortir les caractères les plus saillants qui se dégagent de nos recherches.

La germination.

Après avoir précisé la constitution anatomique et cytologique de la graine, nos recherches ont porté sur l'étude des conditions germinatives et sur l'influence du stimulant excrété par la plante hôte.

Par la suite, nous avons essayé de déterminer la germination de ces graines à l'aide de substances chimiquement définies.

A titre comparatif, nous avons souvent utilisé les graines d'autres espèces d'Orobanches.

De cette étude, que nous avons toutefois entreprise sans contrôle génétique préalable, se dégagent les points suivants :

On ne peut encore, à l'heure actuelle, prévoir les conditions définies dans lesquelles pourraient germer les différentes espèces d'Orobanches.

D'une façon générale, chaque espèce ne germe que sous l'influence d'un

stimulant encore inconnu qu'exerce, dès sa formation, l'assise pilifère de la racine de la plante-hôte.

Jamais le contact avec cette racine n'est nécessaire.

Pour l'Orobanche du Lievre, la lumière et le taux d'humidité n'ont pas d'action déterminante. La température, par contre, nécessite un optimum de 19 à 24° au-delà duquel aucune germination ne peut avoir lieu.

Les études entreprises jusqu'à présent ne permettent pas encore d'expliquer pourquoi les graines de la plupart des espèces ne peuvent naturellement germer d'elles-mêmes dans des conditions normales.

Il semblerait que l'on soit en présence d'une dormance plutôt embryonnaire que tégumentaire, d'origine d'ailleurs très variable avec les espèces.

Pour *P. ramosa*, par exemple, diverses substances telles que la pyridoxine, la nicotamide, les sels de magnésium, la gibberelline suffisent pour déclencher la germination (IZARD, 1953-1954).

Chez *O. Hederæ*, nous avons obtenu de semblables résultats non seulement avec la gibberelline, mais aussi, pour certains lots seulement, avec des biocatalyseurs minéraux.

Jusqu'à ce jour, ce sont d'ailleurs les deux seules espèces que l'on ait réussi à faire ainsi germer avec des substances chimiquement définies.

D'après des recherches très récentes, un petit nombre d'espèces se montrent capables, comme les plantes autotrophes, de germer d'elles-mêmes, simplement sur eau pure : *P. ramosa* (IZARD, 1957), *O. cumana*, (KRENNER, 1958), et *P. arenaria* (PRIVAT, 1959).

Ces résultats nous permettent de concevoir, chez les Orobanchacées, l'existence de différents degrés de parasitisme non seulement entre les espèces, mais à l'intérieur des espèces elles-mêmes.

Il ne serait pas impossible que ces degrés, allant de l'exigence d'un stimulant externe jusqu'à l'autonomie germinative des plantes chlorophylliennes, soient à l'origine, en relation étroite avec la biologie de l'hôte.

O. Hederæ ne parasitant exclusivement qu'un seul hôte, il ne nous a pas été permis d'étudier ce problème.

La graine d'Orobanche, lors de sa germination, ne donne pas naissance à une plante ordinaire pourvue d'une racine, d'une tige et de feuilles, mais à un court filament entièrement parenchymateux et indifférencié.

Son apex, en pénétrant une racine hôte, grossit et se transforme en tubercule dans lequel se forme un foyer morphogène déterminant, pareillement à une culture de tissus, l'organisation de bourgeons endogènes et la différenciation de trachéides reliant le parasite à l'hôte.

Ce germe, sans structure anatomique et morphologique apparente, n'avait, jusqu'à présent, pu être assimilé à aucun organe connu.

VELENOVSKY avait créé pour le désigner, le terme de *procaulome*.

Nos connaissances actuelles sur l'embryologie, la morphologie expérimentale et la biologie des plantes parasites, nous permettent de comprendre plus clairement la nature de cet organe.

À la germination, les cellules embryonnaires qui n'ont pas dépassé le

stade pro-embryon se développent sans se différencier davantage. L'extrémité renflée du procaulome correspondant topographiquement à la radicule et, peut-être, à la partie inférieure de l'hypocotyle, ne sera capable de former la future Orobanche qu'en pénétrant dans une racine-hôte où doivent probablement se trouver des éléments indispensables lui faisant défaut.

C'est certainement le caractère essentiellement hétérotrophe de ce parasite qui est à l'origine de cette singulière germination.

Le développement de ce procaulome n'est pas d'ailleurs sans rappeler étroitement celui des racines de jeunes sporophytes de Fougères.

Comme l'ont montré les travaux expérimentaux de M^{me} Durand-Rivière, ces racines, cultivées sur un milieu approprié, forment, à leur apex, un renflement parenchymateux au sein duquel s'organise une nouvelle plante, d'une façon en tout point comparable à celle du procaulome de l'Orobanche.

Fixation de l'Orobanche sur la racine de Lierre.

Les premiers stades de fixation d'une Orobanche sur la racine-hôte n'avaient jamais pu, jusqu'à présent, être étudiés.

Nous avons obtenu pour la première fois *in vitro* la fixation d'un filament germinatif d'*O. Hederæ* sur une plantule de Lierre. Cette fixation s'opère sur de très fines radicules latérales. Le développement des tissus de l'Orobanche à l'intérieur du Lierre est, à l'origine, très lent.

Nous avons, par la suite, suivi cette pénétration en étudiant un très grand nombre d'Orobanches fixées depuis peu de temps.

Nos observations ne concordent pas dans leur ensemble avec celles effectuées très récemment par certains auteurs sur des espèces voisines :

— dans *O. crenata* (= *O. speciosa*), le parasite forcerait son chemin « en creusant un petit pore dans les cellules de l'hôte » et passerait ainsi à travers « sous forme amiboïde » (KADRY et TEWFIC, 1956) ;

— dans *O. cumana*, le parasite dissoudrait les membranes des cellules de l'hôte, arriverait ainsi jusqu'au paquet vasculaire, puis aspirerait mécaniquement les trachéides de l'hôte « grâce à un vide contenu dans la graine » (KRENNER, 1958).

Personnellement, nous considérons d'une façon toute différente l'union des deux espèces et le mécanisme de cette fixation :

— Tout d'abord, la limite des deux organismes est très nette : les cellules de l'Orobanche se distinguent facilement par leurs caractères méristématiques. Ces cellules se divisent, s'allongent et pénètrent ainsi entre les cellules du Lierre. On n'observe ni passage sous forme amiboïde, ni digestion apparente, mais un écartement imperceptible et lent des cellules de l'hôte.

— Chez ce dernier, tout se passe comme si les cellules en division de l'Orobanche libéraient dans les tissus sous-jacents une ou plusieurs sub-

stances à action hormonale déterminant dans l'hôte une série de transformations.

On observe en effet dans le Lierre, au niveau de la zone d'implantation de l'Orobanche :

1° La division des cellules corticales, ce qui détermine l'hypertrophie de la racine autour de l'Orobanche. Cette hypertrophie n'est donc pas, comme le pensait MIRANDE, chez les Cuscutes, une défense de l'hôte pour allonger le chemin à parcourir par le parasite, mais simplement la réponse à une stimulation hormonale.

2° Une absence de développement de l'assise génératrice libéro-ligneuse sur une zone plus ou moins longue, en relation vraisemblablement avec la structure de la jeune radicule au moment de l'infestation. Il ne se forme ni bois, ni liber ; un vaste rayon parenchymateux apparaît, dont l'ouverture est évidemment orientée vers l'Orobanche.

3° Dans ce rayon ainsi formé, les cellules s'allongent en direction des cellules du parasite.

Dès que l'Orobanche arrive au niveau de cette zone, certaines cellules allongées du Lierre s'incrudent de lignine et se différencient en trachéides ponctuées. C'est donc l'hôte qui constitue le premier les tissus de jonction. Puis, à leur contact, quelques cellules du parasite s'incrudent aussi de lignine et forment des trachéides réticulées. Le contact vasculaire est ainsi réalisé.

Quelquefois, le Lierre ne différencie pas de trachéides ; les cellules de l'Orobanche se lignifient alors au contact du bois préexistant.

Dans tous les cas, tout se passe comme s'il y avait eu, de cellule à cellule, une induction ou diffusion d'une substance déterminant cette lignification.

Une fois la liaison ligneuse ainsi effectuée, les cellules allongées du parasite et les tubes libériens du Lierre s'interpénètrent.

Dans cette jonction, les cellules de l'Orobanche n'ont pas de crible.

Finalement, la progression du parasite s'arrête après la liaison vasculaire des deux espèces.

Il y a une très grande analogie, la progression cellulaire mise à part, entre ce que l'on observe dans la fixation de l'Orobanche sur le Lierre et une greffe.

Les mêmes phénomènes d'induction montrés d'une façon rigoureuse par CAMUS, en 1949, dans les greffes *in vitro* de bourgeons d'Endive et observés nettement en 1959, par HOMES, dans les greffes de Cotonnier, se retrouvent ici.

Nous remarquons que, pareillement à un greffon, l'Orobanche exerce sur les tissus sous-jacents du Lierre :

1° Une action histogène polarisée se traduisant par une dédifférenciation progressive ou plutôt par une absence de fonctionnement d'une partie de l'assise cambiale ;

2° Une division des cellules corticales déterminant le bourrelet autour du parasite ;

3° La différenciation de formations conductrices s'orientant obliquement vers la zone d'implantation du parasite ;

4° Entre les deux organismes, les éléments ligneux néoformés sont des trachéides réticulées ou ponctuées qui se développent entre le porte-greffe et le greffon, c'est-à-dire le Lierre et le parasite.

Tout se passe dans cette fixation comme si le parasite se greffait naturellement de lui-même sur la racine-hôte.

C'est la première fois que de telles observations sont effectuées sur une Orobanche et même, à notre connaissance, sur une plante parasite.

De semblables recherches devront être poursuivies sur d'autres espèces avant qu'on puisse conclure que ces processus de fixation sont identiques chez toutes les Orobanches.

Anatomie et morphologie de l'appareil végétatif aérien.

Une fois le raccordement vasculaire réalisé, la progression de l'Orobanche s'arrête, à l'intérieur du Lierre. Tous les tissus du parasite qui y sont inclus forment le suçoir ou « haustorium ». Cet organe, qui a donné lieu à de nombreuses interprétations, représente par sa position et son rôle physiologique l'homologue de la racine principale des autres plantes.

Au-delà de ce suçoir, les tissus de l'Orobanche s'accroissent à l'extérieur de la racine-hôte pour former un petit tubercule ovoïde. Au sommet de ce tubercule s'organise le futur bourgeon et, à sa base, de petites protubérances se développent par la suite en petits filaments de 1 à 3 mm de large sur 1 à 2 cm de long.

La nature de ces organes a été depuis longtemps discutée. Les dits organes sont : pour VELENOSKY de simples émergences de l'haustorium, pour JULIANO des rhizomes et, pour BLANCHARD, des pseudo-racines. Or, l'étude anatomique de ces protubérances montre une structure primaire diarche ou tétrarche à l'origine, puis nettement secondaire par la suite. A leur extrémité, une coiffe adhère intimement. Ces organes sont des racines privées toutefois d'assise pilifère et possédant un épiderme entièrement subérisé. Nous ne pensons pas que ces racines puissent absorber directement du sol eau et substances minérales. Elles ne forment jamais de suçoirs secondaires, comme c'est le cas pour la plupart des autres Orobanches.

Nous avons là des organes apparemment non fonctionnels, comme ceux de l'Orobanche du Genêt. Dans cette dernière espèce, ces racines existent, mais elles sont enfoncées à la base du tubercule, sans jamais venir à la surface.

Pendant le développement de ces racines s'organise, au sommet du tubercule, le bourgeon endogène d'où sortira la future hampe florale : on voit, sous les deux ou trois assises épidermiques, une série de cellules à cytoplasme dense se diviser dans le sens radial ; bientôt, une fente s'établit et isole le futur bourgeon qui crèvera, au printemps suivant, l'épiderme

subérisé. A ce moment, la croissance est très rapide : en moyenne 1,5 cm par jour.

Au point de vue anatomique, quelques points nous paraissent importants à signaler : tout d'abord, l'existence dans la partie basale de l'Orobanche, hors du contact direct avec les tissus de Lierre, de vrais tubes criblés, nettement caractérisés par de volumineux cals colorables au bleu-coton. Cette observation n'a jamais été faite sur aucune autre espèce d'Orobanche.

Sur la tige, recouverte de volumineux stomates, se trouvent des écailles. A la moitié inférieure de la hampe florale, celles-ci protègent à leur base des bourgeons susceptibles de se développer soit directement sur la hampe elle-même et former ainsi une Orobanche rameuse, soit sur ce qui reste de la partie basale enfouie dans le sol, une fois la hampe détruite en automne.

Dans ce cas, au printemps suivant, on observe entre les écailles noircies, toute une couronne de jeunes bourgeons qui se développent pour former un faisceau très dense d'Orobanches. C'est dans ces conditions que l'Orobanche du Lierre est vivace, mais nous ignorons si celle-ci peut se reproduire plusieurs années de suite.

Étude biochimique.

Si la morphologie et l'anatomie des plantes parasites ont fait l'objet de recherches très nombreuses, la biochimie de ces plantes en a suscité beaucoup moins.

Lorsqu'on résume les travaux effectués sur la nutrition non seulement des Orobanches, mais aussi des autres phanérogames parasites, deux conceptions nettement différentes s'en dégagent.

Ou bien le parasite absorbe totalement la sève élaborée par l'hôte sans effectuer de synthèse particulière ; ou bien, et c'est l'opinion la plus répandue, le parasite privé de chlorophylle n'emprunte à la plante-hôte que les éléments essentiels et indispensables, c'est-à-dire, le glucose et les substances minérales.

L'Orobanche du Lierre n'a pratiquement jamais été étudiée au point de vue biochimique ; la seule indication que nous ayons à ce sujet remonte à MIRANDE, pour qui l'azote minéral est absent dans cette espèce.

Nous avons donc entrepris cette étude en recherchant les principaux éléments se trouvant dans l'hôte et le parasite au niveau du point de fixation, afin de définir les relations biochimiques qui peuvent avoir lieu entre deux organismes si intimement unis.

1° Les pigments. — La plupart des auteurs ont toujours affirmé l'absence de chlorophylle chez les Orobanches. Toutefois, MARCHAL, en 1950, comparait ces espèces à la Cuscuta, qui possède réellement ce pigment. Nous avons donc entrepris la recherche de ce dernier sur un extrait d'*Orobanche Hederæ*, traité suivant la technique de WINTERSTEIN par chroma-

tographie sur colonne à trois adsorbants ; nous n'avons pas trouvé trace de chlorophylle, mais, par contre, nous avons observé la présence de caroténoïdes qui ont pu être extraits et dosés suivant la technique de BRUNEL. Ces composés avaient d'ailleurs été déterminés cytologiquement par EMBERGER, dès 1933.

Ces résultats indiquent :

1° Que la synthèse des caroténoïdes peut se faire en l'absence de chlorophylle ;

2° Que la régression des plastides a dû s'effectuer ici progressivement sous l'influence de la vie hétérotrophe.

2° Les substances glucidiques. — L'amidon est le composé glucidique visiblement le plus abondant ; il se localise surtout dans les cellules hypertrophiées de la partie basale de l'Orobanche, ainsi que dans les régions corticales de la tige, dans les fruits et les graines. Dans les tissus directement sous-jacents de la racine-hôte, l'amidon a disparu.

Cette disparition laissait supposer à la plupart des auteurs que le parasite hydrolyserait, par des enzymes exosmosées par le suçoir, l'amidon de l'hôte afin de se procurer ainsi les glucides indispensables. Nous pensons qu'il est normal que l'amidon disparaisse dans des cellules qui ont été stimulées. Pour nous, cet amidon provient plus vraisemblablement des sucres solubles passant directement d'un organisme dans l'autre.

Nous avons effectué des dosages de glucides réducteurs et non-réducteurs dans l'Orobanche et son hôte à diverses époques et dans ses divers organes. Les résultats obtenus indiquent une évolution du métabolisme glucidique très comparable à celle d'une plante chlorophyllienne ; toutefois, les quantités de glucides, plus faibles dans l'Orobanche que dans l'hôte, laissent supposer une polymérisation très rapide de ces composés dans le parasite.

Afin de caractériser ces éléments, nous avons fait appel à la chromatographie sur papier. Les extraits stabilisés par la méthode de BOURQUELOT ont été désionisés par passage sur résine Permutite C 50 D et A 300 D.

Nous avons retrouvé les mêmes sucres (saccharose, glucose et fructose) dans l'Orobanche et dans le Lierre.

Des expériences d'absorption avec des molécules marquées seraient nécessaires pour déterminer le lieu de passage de ces substances : trachéides tissu libérien ou simplement voie cytoplasmique ?

3° Substances polyphénoliques. — En même temps que les glucides étaient caractérisés, nous avons remarqué la présence, dans les chromatogrammes de l'Orobanche, d'hétérosides polyphénoliques qui n'étaient pas rencontrés dans ceux du Lierre.

Ces hétérosides n'ont pu, jusqu'à présent, être déterminés.

Par contre, à côté de ces composés, nous avons caractérisé dans le parasite et son hôte plusieurs polyphénols, notamment l'acide caféique et l'acide chlorogénique, ainsi que certains de leurs dérivés.

Ces deux acides polyphénoliques ont d'ailleurs été trouvés en même temps que nous, par URBAN en 1958, dans les feuilles de Lierre.

Devant l'abondance de l'acide chlorogénique dans l'Orobanche, ce qui nous a permis de le retrouver malgré le passage dans les résines, nous avons entrepris son extraction. Les techniques employées par GUSEVA, PAECH et TRACEY ne nous ont donné que des résultats décevants. C'est par une technique inédite que nous sommes arrivés, pour la première fois, à isoler à l'état cristallisé ce composé de l'Orobanche. Cet acide n'a été extrait jusqu'à présent que d'une douzaine de plantes seulement, toutes Angiospermes. D'après nos expériences, c'est lui qui est responsable du noircissement de l'Orobanche lors de la dessiccation ou de la section des tissus au contact de l'air. Son rôle physiologique, très important semble-t-il, est à peine ébauché : il agirait, dans certains cas, comme facteur de croissance et, dans d'autres cas, au contraire, comme inhibiteur.

4° Substances azotées. — Les différentes formes d'azote sont représentées dans l'Orobanche : azote protéique, aminé, amidé et minéral.

Au cours de l'évolution de la plante, les divers taux d'azote restent très uniformes. On peut penser à un apport continu de cet élément de la part de l'hôte.

Au moment du plein épanouissement, le métabolisme protidique, envisagé organe par organe, est identique à celui d'une plante chlorophyllienne.

La protéogenèse est beaucoup plus intense dans les fleurs et surtout dans les graines.

La caractérisation des acides aminés nous a montré la présence des mêmes acides dans l'hôte et le parasite : acides aspartique, glutamique et γ -amino-butyrique, asparagine, glutamine, sérine, glycolle, thréonine, alanine, tyrosine, valine, proline, leucine et bases hexoniques.

L'existence des mêmes composés dans les deux espèces suggère que leur passage s'effectue très vraisemblablement directement du Lierre dans l'Orobanche. Ce sont des substances de poids moléculaire très faible et de transport très facile.

Mais il ne serait pas impossible que le parasite fasse la synthèse de certains d'entre eux à partir des glucides et de l'azote minéral qu'il reçoit de la plante-hôte.

La présence de tyrosine dans l'Orobanche laisse aussi supposer qu'elle peut synthétiser les composés phénoliques.

Pour résoudre ces problèmes, des historadiogrammes seraient nécessaires.

5° Considérations sur la nutrition de l'Orobanche du Lierre. — En fonction de ces résultats, comment peut-on concevoir maintenant la nutrition de l'Orobanche du Lierre ?

Nous avons caractérisé dans le parasite et dans son hôte les mêmes glucides (glucose, saccharose, fructose), les mêmes polyphénols (acide caféique et chlorogénique) et les mêmes acides aminés.

La présence simultanée des mêmes substances dans les deux organismes

est-elle une coïncidence, ou bien ces composés contenus dans l'Orobanche proviennent-ils du Lierre ?

Nous pensons que le passage de ces substances entre les deux organismes est très probable.

Il est évidemment difficile de se prononcer là d'une façon catégorique tant que des expériences avec des molécules marquées n'auront pas été effectuées.

Nous ne croyons pas qu'il faille être aussi exclusif que les théories qui ont été jusqu'à présent émises à ce sujet.

On ne peut pas dire que toute la sève élaborée passe de l'hôte dans le parasite. L'Orobanche est très certainement capable d'effectuer de très nombreuses synthèses particulières, mais on ne peut pas affirmer non plus que l'emprunt du parasite se localise exclusivement aux glucides et aux sels minéraux de l'hôte.

Les relations entre les deux organismes sont certainement aussi étroites du point de vue biochimique qu'elles le sont du point de vue cytologique.

Pour nous, l'Orobanche se comporterait comme un greffon privé de chlorophylle, greffé naturellement sur une plante autotrophe. Un grand nombre de substances telles que les glucides, les acides aminés et même les substances polyphénoliques, doivent passer d'un organisme dans l'autre, non seulement par voie vasculaire, mais très vraisemblablement aussi par voie cytoplasmique. Deux arguments très récents viennent d'ailleurs à l'appui de cette hypothèse :

D'une part, la caractérisation d'hétérosides digitaliques d'un poids moléculaire voisin de celui de l'acide chlorogénique, par GRIMMER en 1958, dans une *Cuscuta* fixée sur une *Digitale* ;

D'autre part, le parallélisme des analyses des cations effectuées dans l'Orobanche du Tabac et son hôte par NICOLOFF, et sur les greffes de Cotonnier, par HOMES, en 1959. Dans les deux cas, on note une diminution du calcium et une augmentation du potassium dans le greffon et l'Orobanche, et une inversion du taux de ces éléments dans le porte-greffe et la plante-hôte.

Essais de culture in vitro de l'Orobanche du Lierre.

O. Hederæ étant une des rares Orobanchacées à parasiter d'une façon presque exclusive un seul hôte, nous avons pensé, qu'*a priori* sa culture *in vitro* ne devait être possible que sur son hôte, le Lierre.

La culture du Lierre avait déjà été entreprise par MOREL, mais sans succès. Partis, de la même manière, de fragments de tiges de Lierre implantés dans des milieux de culture très variés, nous avons bien obtenu des proliférations au niveau de l'assise génératrice, ou même débordant cette assise et recouvrant tout l'explantat, mais jamais, tout comme MOREL, nous n'avons réussi nos repiquages.

Devant le grand nombre de substances essayées (lait de Coco, adénine,

kinétine, vitamines et hormones) et les résultats négatifs obtenus, nous avons pensé que ces échecs n'étaient pas d'ordre nutritif, mais physiologique.

Nous nous sommes adressé alors à des axes hypocotylés de Lierre. Ces derniers, implantés dans un milieu nutritif gélosé, ont proliféré suffisamment pour permettre, avec succès, le repiquage de ces cultures.

Ces souches, âgées de treize mois, en sont maintenant à leur cinquième repiquage. La culture des tissus de Lierre peut donc être considérée comme indéfinie.

Mais, par la suite, l'infestation de ces tissus par des graines d'Orobanche, ainsi que la culture de ces graines sur un milieu nutritif gélosé suivant la technique suivie pour les Orchidées sont restées sans résultat.

Nous nous sommes, dès lors, tournés directement vers la culture des tissus de l'Orobanche sur un milieu défini, culture qui n'avait, jusqu'à présent, jamais été entreprise.

Nous avons pour cela appliqué la technique classique de GAUTHERET. Au début, nous n'avons eu que des échecs provenant surtout du fait que, dès que l'on sectionne une Orobanche, des substances polyphénoliques diffusent presque immédiatement dans le milieu de culture, inhibant toute prolifération ; mais, en partant d'un individu moins riche en ces substances, nous avons pu finalement obtenir le développement *in vitro* des tissus d'une Orobanche.

Des fragments exactement cylindriques de 5 mm de diamètre sur 1 cm de long prélevés au moyen d'un trocart dans la partie basale, ont bruni immédiatement sans proliférer.

Par contre, sur ceux prélevés dans l'extrémité de la hampe florale, une assise pilifère s'est développée et des fleurs se sont épanouies.

Ce développement a duré près de vingt-cinq jours, mais un repiquage trop rapide a fait perdre ces explantats.

Nous pensons toutefois que la culture *in vitro* de l'Orobanche doit être possible, mais là, plus que partout ailleurs, on se heurte au difficile problème du prélèvement.

D'après nos observations, *Orobanche Hederæ* est une des espèces les plus riches en acide chlorogénique.

En s'adressant à d'autres Orobanches contenant moins de substances polyphénoliques, on doit obtenir de meilleurs résultats.

Lorsque cette culture sera pleinement réussie, il sera alors possible de connaître avec certitude les exigences nutritives de cette plante holoparasite et de réveiller, en quelque sorte, la synthèse chlorophyllienne que ses plastes devaient vraisemblablement effectuer jadis.

En faisant appel, au cours de ce travail, à de multiples techniques histologiques, biochimiques et physiologiques, de nombreux points inconnus ou contestés ont été précisés.

Une interprétation, entièrement nouvelle du parasitisme se dégage de nos observations mais ne pourra se généraliser que dans la mesure où de semblables recherches seront effectuées sur d'autres Orobanches.

Une tâche importante reste encore à effectuer dans ce domaine.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN (G. S.). — 1957. Storage behavior of conifer seeds in sealed containers held at 0° F, 32° F, and room temperature (*J. Forest.*, U. S. A., **55**, n° 4, p. 27).
- ANSIAUX (J. R.). — 1958. Sur l'alimentation minérale des phanérogames parasites (*Acad. Roy. Belg., Bull. Cl. Sci.*, **44**, n° 9, p. 787-792).
- BALANSARD (J.). — 1951. Considérations sur les saponosides. II. Recherches biologiques sur les saponosides (*Ann. Pharm. Fr.*, **9**, n° 12, p. 743-747).
- BALL (G.). — 1950. Differentiation in a callus culture of *Sequoia sempervirens* (*Growth*, **14**, p. 295-325).
- BARTON (G. M.), EVANS (R. S.) et GARDNER (J.). — 1952. Paper chromatography of phenolic substances (*Nature*, London, **170**, p. 249-250).
- BARTSINSKY (R. M.). — 1932. Contribution à l'étude physiologique de la germination d'*Orobanche cumana* (*Bull. Krasnodar*, n° 2, 3. Cité par IZARD et HITIER, 1953, p. 53).
- BECK-MANNAGETTA (G.). — 1895. Orobancheaceae (*Die Natürlichen Pflanzen-familien*, Engler A. et Prantl K. teil 4 Abt., 3, p. 123-127).
- BERTHON (R.). — 1943. Sur l'origine des radicules chez les Angiospermes (*C. R. Acad. Sc.*, **216**, p. 308-309).
- BERTOSSI (F.). — 1955. Ricerche sulla fisiologia della *cuscuta epithymun*. 1° La coltura *in vitro* (*Inst. Bot. Univ. Lab. Crittog. Pavia, Atti*, **14**, n° 1-3, p. 174-192).
- BINET (P.). — 1958. La germination des semences de *Zilla macroptera* Coss. dans des sables d'humidité variable (*C. R. Acad. Sc. Fr.*, **246**, p. 309).
- BLANCHARD (M.). — 1952. Contribution à l'étude de la biologie de l'Orobanche et à sa destruction (*Ann. Inst. Agric. Serv. Rech. expér. Agric. Algérie*, **6**, n° 9, 1-49).
- BODEA (C.), FLORESCU (M.) et DRUGAN (V.). — 1958. Contributii la biosinteza carotenoidelor (*Stud. Cerc. Biochem.*, **1**, n° 2, p. 109-14. Résumé français).
- BONNIER (G.) et LECLERC DU SABLON (M.). — 1901. *Cours de Botanique*, t. I, p. 410.
- BORRESCH (K.). — 1935. Gehalt des Pflanzen an Mineralstoffen (*Tabulæ Biologicæ*, **10**, p. 315-353 et **11**, p. 136-191. Cité par ANSIAUX).
- BORZI (Z.). — 1953. Studio sul meccanismo d'azione parassitaria dell' *Orobanche crenata* (*Ann. di Fitopat.*, **2**, p. 3-14).
- BOUGY (E.). — 1933. Chimisme de quelques hybrides de Betterave (*Thèse Doct. ès Sc., Paris*).
- BOULLARD (B.). — 1953. Les champignons endophytes des Araliacées (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **100**, nos 1-3, p. 75-77). — 1954. L'infection micorrhizienne expérimentale des plantules d'*Hedera Helix* L. (*VIII^e Congrès Int. Bot. Paris Sect.*, **13**, p. 134-135). — 1954. Nouvelles observations relatives à l'infection mycorrhizienne expérimentale des plantules d'*Hedera Helix* L. (Araliacées) (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **101**, nos 7-9, p. 361-363).
- BOUREAU (E.). — 1954. *Anatomie végétale*, P. U. F. (3 tomes).
- BOURIQUET (G.). — 1954. Le Vanillier et la Vanille dans le monde (*Encyclopédie Biologique*, Paul Lechevalier, édit., Paris, 748 p.).
- BRIDEL (M.). — 1924. Étude biochimique sur la composition du *Monotropa Hypopitys* L. : obtention d'un nouveau glucoside, la monotropéine (*Journ. Pharm. Chimie*, 7^e série, **29**, p. 96).
- BRIDEL (M.) et CHARAUX (C.). — 1924. L'Orobanchine, glucoside nouveau retiré des tubercules d'*Orobanche rapum* DC. (*C. R. Acad. Sc.*, **178**, p. 1839-1842). — 1925 a. Sur le processus de noircissement des Orobanches au cours de leur dessiccation (*C. R. Acad. Sc.*, **180**, p. 387-388). — 1925 b. Sur le processus du noircissement des Orobanches au cours de leur dessiccation (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, **7**, p. 474-485).
- BROWN (R.), GREENWOOD (A. D.), JOHNSON (A. W.), LANSDOWN, LONG (A. G.) et SUNDERLAND. — 1952. The Orobanche germination III. Concentration of the factor by counter current distribution (*Biochem. Journ.*, London, **52**, p. 571-574).

- BROWN (R.), GREENWOOD (A. D.), JOHNSON (A. W.) et LONG (A. G.). — 1951 *a*. The stimulant involved in the germination of *Orobancha minor* Sutt. (*Biochem. Journ.*, London, **48**, p. 559-564).
- BROWN (R.), GREENWOOD (A. D.), JOHNSON (A. W.), LONG (A. G.) et TYLER (G. Z.). — 1951 *b*. The stimulant involved in the germination of *Orobancha minor* Sutt. (*Biochem. Journ.*, London, **48**, p. 564-569).
- BRUNEL (A.). — 1952. *Traité pratique de Chimie végétale* (4 tomes).
- CAMUS (G.). — 1949. Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogenèses (*Thèse Doct. ès Sc.*, Paris et in *Rev. Cytol. et Biol. végét.*, **11**, p. 1-199).
- 1954. Action de la pénicilline G sur la croissance des tissus normaux et tumoraux cultivés *in vitro* (*C. R. Acad. Sc.*, **238**, p. 1058).
- CARLES (J.). — 1956. L'évolution des glucides du Blé (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **103**, p. 137-142).
- CARLES (J.), SCHNEIDER (A.) et LACOSTE (A. M.). — 1958. Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, n° 1, p. 221-31).
- CARRE (M.). — 1959. Nature et rôle de quelques substances à fonction acide excrétées par les racelles des végétaux supérieurs (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **106**, nos 1-2, p. 13-16).
- CASPARY (R.). — 1854. Ueber Samen, Keimung, Specien und Nahrpflanzen der Orobanchen (*Flora-Jahrg.*, **12**, Bd. 1, t. III, p. 577-597 ; cité par KRENNER, 1958, p. 114, Analyse in *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 1854, **1**, p. 334-335).
- CHABROLIN (Ch.). — 1935. Germination des graines et plante hôte de l'Orobancha de la Fève (*Orobancha speciosa* DC.) (*C. R. Acad. Sc.*, **200**, p. 1794). — 1938. La germination des graines de l'Orobancha speciosa (*C. R. Acad. Sc.*, **206**, p. 1990).
- CHARAUX (C.). — 1910. Sur l'acide chlorogénique. Fréquence et recherche de cet acide dans les Végétaux (*Journ. Pharm. Chimie*, 7^e série, **2**, p. 292).
- CHATIN (A.). — 1856-1867. *Anatomie comparée des Végétaux*, 2^e partie, « Végétaux parasites », Paris. (Cité par HOVELACQUE, 1888, p. 555.) — 1891. Contribution à la biologie des plantes parasites (*C. R. Acad. Sc.*, **112**, p. 599).
- CHATTON (E.). — 1927. La micro-inclusion à l'agar-paraffine, technique protistologique. — *Bull. d'histologie appliquée*, **4**, n° 9, 9 p.
- CHEMIN (E.). — 1920. Observations anatomiques et biologiques sur le genre *Lathræa* (*Ann. Sc. Nat.*, 2^e série, Bot., 10^e série, **2**, p. 125-272).
- CHEVAUGEON (J.). — 1957. Mode d'action des Champignons parasites (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **104**, p. 56-101).
- CHODAT (R.). — 1920. *Principes de Botanique*, 3^e éd.
- CHOLLET (M. M.). — 1954. Influence de la température et de la teneur en eau de la phase entraîante sur la valeur du Rf dans la microchromatographie sur papier de divers oses et osides (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **101**, p. 378).
- CHRISTMANN (C.). — 1960. *Le Parasitisme chez les plantes*, Coll. A. Collin, n° 338, 211 p.
- CRÉTÉ (P.). — 1942. « Recherches histologiques et physiologiques sur l'embryologie des Labiatiflores. Contribution à l'étude des formations haustoriales. » (*Thèse Doct. ès Sc.*, Paris). — 1955. L'application de certaines données embryologiques à la systématique des Orobanchacées et de quelques familles voisines (*Phytomorphology [India]*, **5**, n° 4, 422-435).
- CRÉTÉ (P.). — 1959. *Précis de botanique*, Masson et C^{le}, édit., Paris.
- CURTISS (O. F.) et CLARK (D. G.). — 1950. An introduction to plant physiology, New-York, 1-752. Cité par ANSIAUX.
- DAVID (R.). — 1957. Sur la germination du Pin maritime (*Bull. Soc. Fr. Phy. Végét.*, **3**, vol. 2, p. 64).
- DEDONDER (R.). — 1952. Les glucides du Topinambour (*Thèse Doct. ès Sc.*, Paris).
- DEHAY (Ch.) et CARRE (M.). — 1957. Étude de la composition de quelques excréments radicellaires (*C. R. Acad. Sc.*, **244**, p. 230). — 1958. Étude de la composition des excréments radicellaires de quelques légumineuses d'origine africaine (*C. R. Acad. Sc.*, **247**, p. 336).

- DEYSSON (G. et M.). — 1952. Action du méso-inositol sur la germination et la croissance de divers Angiospermes (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **99**, Mémoires, p. 143-155).
- DONINI (B.). — 1959. La germinazione dei semi di *Orobancha ramosa* L. indipendentemente della presenza dell'ospiti (*Agric. Ital.*, **59**, 6, p. 219-22).
- DUCHARTRE (P.). — 1845. Note sur l'anatomie de l'*Orobancha Eryngii* Vaucher (*Ann. Sc. Nat.*, 3^e série, **4**, p. 74-79).
- DUQUENOIS (P.) et GREIB (E.). — 1956. Les principes antibactériens de la Piloselle, *Hieracium Pilosella* L. (*Ann. Pharm. Fr.*, **14**, p. 685-690).
- DURAND-RIVIERES (M^{me}). — 1960. Sur la culture *in vitro* de racines isolées de jeunes sporophytes de *Pteris longifolia* (Polypodiacees) (*C. R. Acad. Sc.*, séance du 21 mars 1960).
- EMBERGER (L.). — 1925 a. Le chondriome des Végétaux (*C. R. Acad. Sc.*, **181**, p. 226-228). — 1925 b. Sur la reversion des plastes chez les Végétaux (*C. R. Acad. Sc.*, **181**, p. 879-880).
- EMBERGER (L.). — 1927. Nouvelles recherches sur le chondriome de la cellule végétale (*Rev. Gén. Bot.*, **39**, p. 1-50). — 1952. Tige, Racine, Feuille (*Coll. Intern., C.N.R.S., sur l'évolution des Plantes*, Paris, 15-20 mai 1952).
- FAVARGER (C.). — 1954. Sur une formation curieuse de l'albumen pendant la germination (*Bull. Soc. Bot. Suisse*, **64**, p. 84-93).
- FRAYSSE (A.). — 1906. Contribution à la biologie des Plantes phanérogames parasites (*Thèse Doct. ès Sc.*, Paris, 175 p.).
- FRITSCH (E.), BOUILLENNE-WALRAND (M.) et BOUILLENNE (R.). — 1958. Quelques observations sur la biologie de *Cuscuta europæa* L. (*Bull. Classe Sciences Ac. Roy. Belgique*, 5^e série, **44**, n° 3, p. 163-187).
- GALANTI (M.). — 1958. Influence des éléments minéraux sur la séparation des sucres par chromatographie de partage sur papier (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, n° 1, p. 265).
- GAUMANN (E.) et KERN (H.). — Ueber die Isolierung und den chemischen Nachweis des Orchinols (*Phytopathologische Zeitschrift*, **35**, 4, p. 345-356). — 1959. Ueber chemische Abwehrreaktion bei Orchideen (*Phytopathologische Zeitschrift*, **36**, 1, p. 1-26).
- GAUTHERET (R. J.). — 1942. *Manuel technique de culture des tissus végétaux*, Masson et C^{ie}, édit., Paris).
- GAUTHERET (R. J.). — 1955. Sur la variabilité des propriétés physiologiques des cultures de tissus végétaux (*Rev. Gén. Bot.*, **62**, p. 5-112). — 1959. *La Culture des tissus végétaux*, Masson et C^{ie}, édit., Paris.
- GAUTIER (L.). — 1908. Sur le parasitisme de *Melampyrum pratense* (*Rev. Gén. Bot.*, **20**, p. 67-84).
- GENTY (P.). — 1952. Sur une Orobanche critique : *Orobancha Malinskyana* Rouy (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **99**, n°s 4-6, p. 200-202).
- GERTRUDE (M. Th.). — 1937. Action du milieu extérieur sur le métabolisme azoté végétal (*Thèse Doct. ès Sc.*, Paris).
- GRANEL (M.). — 1887. Sur l'origine des suçoirs des plantes parasites (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **34**, p. 313-321).
- GRASSE (P. P.). — 1935. *Parasites et parasitisme*, Coll. A. Collin, 224 p.
- GRIFFITHS (L. A.). — 1958. Phenolic acids and Flavonoids of *Theobroma cacao* L. Separation and identification by paper chromatography (*Biochem. Journ.*, **70**, p. 120-125).
- GRIMMER (G.), MACHLEIDT (H.), SCHWANITZ (F.) et TSCHESCHE (R.). — 1958. Selektive Aufnahme von Digitalisglykosiden, durch Cuscutaarten (*Naturforsch., B. Dtsch.*, **13**, n° 10, p. 672-677).
- GUILLIERMOND (A.) et MANGENOT (G.). — 1933. *Traité de Cytologie végétale*, Librairie E. Le François, Paris, 1195 p.
- GUSEVA (A. R.). — 1954. Isolation of chlorogenic acid from leaves of *Eucommia* and its determination (*Doklady Akad. Nauk S. S. S. R.*, **94**, 1137-9. Cf. *Chem. Abst.*, 1955, 6142 e).
- GUSTAFSON (F. G.). — 1946. Influence of external and internal factors on growth hormones in green plants (*Plant. Physiol.*, **21**, p. 49-62. Cité par TRUSCOTT, p. 176).

- HALLER (R.). — 1949. Characters of the cell-wall substance of heterotrophic plants (*Ber. Schweiz. Botan., Ges.*, **59**, p. 155-61 ; *Chem. Abst.*, 1951, 218 a).
- HARBORNE (J. B.). — 1958. Identification of the flavone pigment of *Phælipæa ramosa* (*Chem. and Industry*, G.-B., **48**, p. 1590-1591).
- HEILBRON (I.) et COOK (A. H.). — 1951. Caroténoïdes et vitamines A. La fin d'un chapitre (*Endeavour*, **10**, n° 40, p. 175-182).
- HEINRICHER (E.). — 1909. De la germination des graines des plantes parasites, en particulier de celles des Rhinanthacées (*Rev. Gén. Bot.*, **21**, p. 329-334).
- HELLER (R.). — 1954. Les besoins minéraux des tissus en culture (*L'Année biologique*, **30**, nos 7-10, p. 261-268).
- HENRIKSSON (L. E.). — 1951. Asymbiotic germination of Orchids and some effects of vitamins on *Thunia Marshalliana* (*Svensk Botanisk Tidskrift*, **45**, n° 3, p. 447-459).
- HERRMANN (K.). — 1956. Über Kaffeesäure und chlorogensäure (*Die Pharmazie*, **11**, p. 433-449).
- HÖPFNER (W.). — 1932. Zwei neue Reaktionen für Kaffeesäure und chlorogensäure (*Chem. Ztg.*, **56**, p. 991).
- HOMES (J. L. A.). — 1958. Contribution à l'étude histologique de la greffe de *Gossypium hirsutum* L. (*C. R. Soc. Biol. Fr.*, **152**, n° 7, p. 1205-1208). — 1959. Les échanges de cations entre le porte-greffe et le greffon (*Ann. de Phys. végét. Univ. Bruxelles*, fasc. 1, p. 1-52).
- HOVELACQUE (M.). — 1888. Recherches sur l'appareil végétatif des Bignoniacées, Rhinanthacées, Orobanchées et Utriculariées (*Thèse Doct. ès Sc., Paris*, série A, n° 110).
- HUGUET (R.). — 1955. Étude cinétique et chromatographique d'hydrolysats protéiques (*Thèse Doct. Pharm. État, Montpellier*, n° 24, 196 p.).
- HULME (A. C.). — 1958. Transformation des constituants phénoliques de la « peau » des pommes et des poires pendant la croissance et la senescence (*Bull. Soc. Fr. Phys. Végét.*, **4**, 1, p. 43-50).
- IZARD (C.). — 1957. Sur la germination de l'Orobanche parasite du Tabac (*Bull. Soc. Fr. Phys. végét.*, **3**, n° 3, p. 92-93). — 1958. Recherches biochimiques sur les graines de l'Orobanche du Tabac. 1. Variations des acides aminés et des sucres. 2. Obtention d'un pigment flavonique (*Ann. Inst. expér. Tabac*, Bergerac, **3**, 1, p. 77-83).
- IZARD (C.) et HITIER (H.). — 1953. Obtention de la germination *in vitro* des graines d'Orobanché du Tabac (*Ann. Inst. expér. Tabac*, Bergerac, **1**, n° 4, p. 47-56). — 1954. Nouvelles recherches sur la germination des graines de l'Orobanche parasite du Tabac (*Ann. Inst. expér. Tabac*, Bergerac, **2**, n° 1, p. 9-13). — 1958. Action du 1.3 dichloropropane 1.2 dichloropropène, de la rindite et de la gibberelline, sur la germination des graines de l'Orobanche, parasite du Tabac (*C. R. Acad. Sc.*, **246**, p. 2659-2661).
- IZARD (C.) et MASQUELIER (J.). — 1958. Sur un pigment flavonique extrait des graines de *Phælipæa ramosa* (*C. R. Acad. Sc.*, **246**, p. 1454-1456).
- JACQUIOT (Cl.). — 1947. Effet inhibiteur des tanins sur le développement *in vitro* de cambium de certains arbres forestiers (*C. R. Acad. Sc.*, **225**, p. 434).
- JAMES (W. O.). — 1954. Chaines de réactions en respiration végétale (*Endeavour*, **13**, 51, p. 161).
- JAUME SAINT-HILAIRE. — 1807. *Mémoires de l'Institut* (cité par VAUCHER, 1827, p. 8).
- JEREMIAS (K.). — 1958. Ueber den Jahresgang einiger Zucker in den Blättern von *Hedera Helix* L. (*Planta, Allem.*, **52**, n° 2, p. 195-205).
- JOHNSON (G.), MAYER (M.) et JOHNSON (D. K.). — 1951. Isolation and characterization of Peach tannins (*Food Res.*, **16**, n° 3, p. 169-180).
- JOHNSON (G.) et SCHAAL (L. A.). — 1952. Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potatoes (*Science*, U. S. A., **115**, n° 2997, p. 627-629). — 1957. Chlorogenic acid and other orthodihydroxyphenols in scab-resistant Russet Burbank and scabsusceptible Triumph potato tubers of different maturities (*Phytopathology*, **47**, p. 253-255).
- JOLDBAUER. — 1886. Die Bestimmung des Stickstoffes in nitraten nach der Kjeldahl'schen methode (*Chem. centralb.*, **17**, p. 433).

- JULIANO (J. B.). — 1935. Anatomy and morphology of the Bunga, *Æginetia indica* L. (*Philippine Journ. Sc.*, **56**, p. 405-451. Cité par METCALFE et CHALK, 1950, **2**, p. 989).
- KADRY (Abd El Rahman) et TEWFIC (Hussein). — 1956 a. Seed germination in *Orobanche crenata* FORSSK (*Botanisk Tidskrift*, **50**, n° 2, p. 270-286). — 1956 b. A contribution to the morphology and anatomy of seed germination in *Orobanche crenata* (*Botanisk Notiser*, **109**, fasc. 4, 385-399).
- KIERMEIER (F.) et RICKERL (E.). — 1955. Cause of discoloration of steamed potatoes. 1. Influence of phenolic materials (*Z. Lebensm. Untersuch. U. Forsch.*, **100**, 441-9. Cf. *Chem. Abst.*, 1955, 12747 i).
- KIRKHAM (D. S.). — 1957. The Significance of Polyphenolic Metabolites of apple and pear in the Host Relations of *Venturia inæqualis* and *Venturia pirina* (*J. gen. Microbiol.*, **17**, p. 491. Cité par HULME, 1958, p. 50).
- KNUDSON (L.). — 1950. Germination of seeds of *Vanillia* (*Amer. Journ. of Bot.*, **37**, p. 241-247).
- KOCH (L.). — 1878. Ueber die Eatwicklungsgeschichte des Samens der Orobanchen (*Jahrb. Wirr. Bot.*, **11**, 218-221. Cité par KADRY et TEWFIC, 1956, p. 387). — 1887. *Die Entwicklungsgeschichte der Orobanchen mit besonderer Berücksichtigung ihrer Beziehungen zu den Kulturpflanzen*, Heidelberg, 1887. (Cité par KRENNER, 1958, p. 114.)
- KRENNER (J. A.). — 1958. The natural history of the sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). 1. The morphological anatomy of the sunflower broomrape seed. Its germination and the infection mechanism of its germs (*Acta Botanica Acad. Scient. Hungariæ*, IV, fasc. 1-2, 113-144).
- KRETOVITCH (V. L.) et USPENSKAYA (V.). — 1954. A method for isolation of chlorogenic acid from sunflower seeds (*Biokhim. zerna Akad. Nauk S. S. S. R.*, Sbornik, **2**, 202-7. Cf. *Chem. Abst.*, 1955, 8562 g).
- KUC (J.), HENZE (R. E.), ULLSTRUP (A. J.) et QUACKENBUSH (F. W.). — 1956. Chlorogenic and caffeic acids as fungistatic agents produced by potatoes in response to inoculation with *Helminthosporium carbonum* (*Journ. Amer. Chem. Soc.*, **78**, p. 3123-3125).
- LASCOMBES (S.). — 1954. Caractérisation par chromatographie du maltose contenu dans les tubercules jeunes d'*Aconitum Napellus* L. (*Toulouse Pharm.*, **1**, n° 1, p. 31-32). — 1955. Morphogénèse et métabolisme glucidique d'*Aconitum Napellus* L. en fonction de l'altitude (*Bull. Soc. Hist. Nat.*, Toulouse, **90**, p. 17-83).
- LECLERC DU SABLON (M.). — 1887. Recherches sur les organes d'absorption des plantes parasites (*Ann. Sc. Nat.*, série 7, *Bot.*, **6**, p. 90-117).
- LOO (S. W.). — 1945. Cultivation of excised stem tips and intact plants under steriles conditions (*Thèse, California Institute of Technology*, Pasadena, Californie).
- LORY (Ch.). — 1847. Observations sur la respiration et la structure des Orobanches et autres plantes dépourvues de parties vertes (*Ann. Sc. Nat.*, 3^e série, **8**, p. 158-172).
- LUBIMENKO (M. V.). — 1926. Recherches sur les pigments des plastes et sur la photosynthèse (*Rev. Gén. Bot.*, **38**, p. 307).
- LUTZ (L.). — 1908. Sur l'accumulation des nitrates dans les plantes parasites et saprophytes et sur l'insuffisance de la diphénylamine sulfurique comme réactif microchimique (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **55**, p. 104). — 1912. L'azote dans les plantes parasites (*C. R. Acad. Sc.*, 1912, **154**, p. 1247-1249).
- MANGENOT. — 1947. Recherches sur l'organisation d'une Balanophoracée : *Thonningia coccinea* Vahl. (*Rev. Gén. Bot.*, **54**, p. 201-244 et 271-293).
- MARCHAL (Em.) et LATHOUWERS (V.). — 1950. *Éléments de Physiologie végétale*, 2^e éd., J. Duculot, édit., Gembloux, 343 p.).
- MARIAT (F.). — 1951. Contribution à l'étude de la symbiose dans ses rapports avec les facteurs de croissance (*Thèse Doct. ès Sc.*, Paris).
- METCALFE (C. R.) and CHALK (L.). — 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*, Oxford at the Clarendon Press, vol. II, *Orobanchaceæ* : p. 988-991.
- MILLER (C. O.), SKOOG (F.), OKUMARA (F. S.), SALTZA (M. H. von) et STRONG (F. M.). —

1956. Isolement structure et synthèse de la kinétine, une substance provoquant la division cellulaire (*Journ. Am. Chem. Soc.*, **78**, p. 1375).
- MIRANDE (M.). — 1901. Recherches physiologiques et anatomiques sur les Cuscutacées (*Thèse Doct. ès Sc.*, Paris, série A, n° 375). — 1907. Les plantes phanérogames parasites et les nitrates (*C. R. Acad. Sc.*, **145**, p. 507). — 1907. Sur la Rhinanthine (*C. R. Acad. Sc.*, **145**, p. 439-442).
- MOREL (G.). — 1945. Recherches sur le développement de fragments de lianes cultivés *in vitro* (*Bull. Soc. Bot.*, **92**, p. 98-102). — 1948. Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux (*Ann. Épiphyties, Fr.*, **14**, n° 5 [série « Path. Végét. »], p. 1-112).
- MOREL (G.) et MARTIN (C.). — 1955. Guérison de Pommes de terre atteintes de maladies à virus (*C. R. Acad. Agric. Fr.*, séance du 8 juin 1955).
- MULLER (K. O.). — 1941. Ueber einige Pfropfversuche mit *Orobanche crenata* und *ramosa* und ihren Wirten (*Phytopath. Z.*, **13**, p. 530-532).
- MÜNCH. — 1930. *Die Stoffbewegungen in der Pflanze*, Jena, p. 234. (Cité par ANSIAUX.)
- NAPPZINN (K. J.). — 1958. Ueber den Einfluss von KH_2PO_4 auf die Vernalisation (*Z. Bot. Disch.*, **46**, n°s 5-6, p. 506-515).
- NETIEN (G.) et LACHARME (J.). — 1956. Variation du métabolisme des acides aminés au cours de la croissance d'une plantule de Radis sous l'action du chlorhydrate d'oxytétracycline (*Lyon Pharm.*, **7**, p. 169-176).
- NICKELL (L. G.). — 1948. Heteroplastic grafts (*Science*, **108**, p. 389-392. Cité par CAMUS, 1949, p. 28).
- NICOLOFF (Th.). — 1923. Contribution à la physiologie de la nutrition des parasites végétaux supérieurs (*Rev. Gén. Bot.*, **35**, p. 545-552 et 593-601).
- NITSCH (J. P.) et NITSCH (C.). — 1959. Synergie d'action entre les dérivés de l'acide chlorogénique et l'acide 3-indolylacétique (*Bull. Soc. Bot. Fr.*, **106**, n° 9, p. 414-416).
- NOBÉCOURT (P.). — 1946. Les mécanismes de l'immunité naturelle chez les Végétaux (*Rev. Inter. Bot. Appl. Agric. trop. Fr.*, **26**, p. 529-542).
- OPPENHEIMER (H. R.). — 1959. L'adaptation à la sécheresse : le xérophytisme (*Projet relatif aux recherches scientifiques sur les terres arides*, U. N. E. S. C. O., 28 mai 1959).
- PAECH (K.) et TRACEY (M. V.). — 1955. *Modern methoden der Pflanzen-analyse*, Springer-Verlag, Berlin (4 tomes).
- PARTIDGE (S. M.). — 1949. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars (*Nature*, **164**, n° 4167, p. 443).
- PIERCE (G. J.). — 1894. A contribution to the physiology of the germs *Cuscuta* (*Ann. of Bot.*, **8**, p. 53-118).
- PILLET (P.) et COLLET (G.). — 1959. Acide gibberellique et destruction auxinique *in vitro* (*C. R. Acad. Sc.*, **249**, p. 298-299).
- POLITIS (J.). — 1947. Sur une nouvelle méthode concernant la localisation microchimique de l'acide chlorogénique dans les plantes (*C. R. Acad. Sc.*, **225**, p. 954). — 1948. Sur la distribution de l'acide chlorogénique dans la famille des Solanacées et dans les organes de ces plantes (*C. R. Acad. Sc.*, **226**, p. 692-693). — 1949. Sur la distribution de l'acide chlorogénique dans la famille des Composées et dans les organes de ces plantes (*C. R. Acad. Sc.*, **228**, p. 265).
- PRIVAT (G.). — 1959. Isolement et caractérisation de l'acide chlorogénique des tissus d'*Orobanche Hederæ* Duby (*C. R. Acad. Sc.*, **249**, p. 456-457). — 1959. La culture *in vitro* des tissus de Lierre (*Hedera Helix* L.) (*Naturalia Monspeliensa*, série « Bot. », fasc. 10, p. 91-96).
- RABINOWITCH (M.). — 1955. La photosynthèse dans ses rapports avec les phénomènes apparents *in vivo* et *in vitro* (*Bull. Soc. Fr. Physiol. végét.*, n° 2, p. 26-32).
- RACOVITZA (A.). — 1958. *Carum ajowan* Benth. et Hook, une nouvelle et intéressante plante nourricière d'*Orobanche ramosa* L. (*J. d'Agric. trop. et de Bot. appl.*, **5**, n°s 6-7 p. 490-496). — 1959. Nouvelles observations sur la germination des graines d'*Orobanche ramosa* L. (*J. d'Agric. trop. et de Bot. appl.*, **6**, n°s 1-2-3, p. 111-114).
- RAINES (M. A.). — 1937. Culture de graines sur mèche de papier traversée par un courant d'eau de vitesse variable (*Am. J. Bot.*, **24**, p. 185).

- RAWAT (V. S.) et AMBASHT (R. S.). — 1958. Root relations of *Orobanche* and its hosts (*Curr. Sc. India*, **27**, 11, p. 445-446).
- RICHTER (A.). — 1925. Zur Physiologie von *Orobanche cumana*. Der Transpirationsprosetz (*Arb. Abt. angew. Bot. Landw. Versuchsamt.*, Saratow, n° 34 [en russe]. Cité par SCHMUCKER, 1958, p. 519).
- ROSSETTI (V.) et MOREL (G.). — 1958. Le développement du *Puccinia Antirrhini* sur les tissus de Muflier cultivés *in vitro* (*C. R. Acad. Sc.*, **247**, p. 1893).
- RUBINSSTEIN (M. M.), MENSHIKOV (G. P.) et MASSAGETOV (P. S.). — 1953. Alkaloids of *Orobanche lutea*. 1. New alkaloid orobanhamine (*Zhur. Obshechi Khim.*, **23**, p. 156 ; *Chem. Abst.*, 1954, 696 h).
- RUCKENBROD (H.). — 1955. Untersuchungen über den Umsatz der Chlorogensäure in höheren Pflanzen (*Planta [Berl.]*, **46**, p. 19-45).
- SAINT-AMAND (D. de). — 1958. Méthodes d'analyses physiques et chimiques des terres appliquées au laboratoire de la station de l'Alaotra (Madagascar) (*Agron. trop.*, **13**, n° 1, p. 102-115).
- SCHMUCKER (Th.). — 1959. Orobanchaceae-in *Handbuch der Pflanzen-physiologie*, **11**, Heterotrophie-Springer-Verlag-Berlin, p. 515 à 525).
- SCHUMACHER (W.) et HALBSGUTH (W.). — 1938. Ueber den Anschutz einiger höherer Parasiten an die Siebröhren der Wirtspflanzen (*Jb. wiss. Bot.*, **87**, p. 324-355).
- SHIBOAKA (H.) et IMASEKI (H.). — 1957. Identification of growth inhibitors in *Helianthus* leaves (*Bot. Mag. Jap.*, **70**, nos 833-834, p. 362-369).
- SOLMS-LAUBACH (H. de). — 1868. Ueber den Bau und die Entwicklung der Ernährungsgorgane parasitischer Phanerogamen (*Pringsheim's Jahr. f. wiss. Bot.*, **6**, p. 522-528. Cité par KRENNER, 1958, p. 114).
- SOUÈGUES (R.). — 1935 et 1936. *Exposés d'embryologie et de morphologie végétale*, 3 fasc., Hermann, édit., Paris.
- STANGANELLI (M.). — 1947. Composizione chimica dei semi di *Orobanche speciosa* (*Ann. Sper. agrar.*, **1**, p. 97-114).
- SUSPLUGAS (J.), LALAURIE (M.), PRIVAT (G.) et NOMDEDEU (M. P.). — 1958. Métabolisme glucidique d'*Orobanche Hederæ* Duby. Identification chromatographique des sucres libres dans le parasite et son hôte (*Bull. Soc. Pharm. Montpellier*, **18**, fasc. 3, p. 169-172).
- TAMARI (K.) et KAJI (J.). — 1953. Studies on the mechanism of injurious action of 2-méthyl pyridine 4-carboxylic acid on plant growth (*J. Agric. Chem. Soc. Jap.*, **27**, 3, p. 144-147, 147-150 ; 4, p. 159-161 ; 5, p. 245-249, 249-252 ; 6, p. 302-306. Cité par CHEVAUGEON, 1957, p. 75).
- TATE (P.). — 1925. On the anatomy of *Orobanche Hederæ* Duby, and its attachment to the host (*The New Phytologist*, London, **24**, p. 284-293).
- THODAY (D.). — 1958. Modes of union and interaction between parasite and host in the Loranthacées. IV. *Viscum obscurum* on *Euphorbia polygona* (*Proc. Roy. Soc.*, série B, G.-B., **149**, n° 934, p. 42-57).
- TIAGI (B.). — 1951. Studies in the family Orobanchaceae. III. A contribution to the embryology of *Orobanche cernua* Loeffl. and *O. ægyptiaca* Pers. (*Phytomorphology [India]*, **1**, nos 3-4, p. 158-169).
- TOMASZEWSKI (M.). — 1959. Chlorogenic Acid-Phenolase as a System Inactivating Auxin Isolated from Leaves of Some *Prunus* L. Sp. (*Bull. Acad. Polonaise des Sc.*, Cl. 11, **8**, n° 4, p. 127-130).
- TONNIER (J. P.). — 1952. Le Vanillier (*Rech. agr. Madagascar*, n° 1, C. R., p. 55-59, Tananarive).
- TOOLE (E. H.), HENDRICKS (S. B.), BORTHWICK (H. A.) et TOOLE (V. K.). — 1956. Physiology of seed germination (*Annual Rev. of Pl. physiology*, **7**, p. 299-324).
- TRONCHET (J.). — 1958. Réponse des plantules de *Cuscuta Gronovii* Willd. à l'action de l'acide 2-4-dichloro-phénoxy-acétique à 0,2 p. 100 (*Ann. Sc. Univ. Besançon*, 2^e série, *Bot.*, **10**, p. 35).
- TRUSCOTT (F. H.). — 1958. On the regeneration of newshoots from isolated dodder haustoria (*Amer. J. Bot.*, **45**, n° 3, p. 169-177).

- URBAN (R.). — 1958. Physiologische untersuchungen über einige Flavonoide und Oxyzimtsäuren. 1. Auswahl und identifizierung der Bearbeiteten stoffkomponenten (*Planta* [Berl.], **52**, p. 47-64).
- URITANI (I.), HOSHIYA (J.) et TAKITA (S.). — 1953. The mecanism of greening occuring on the sound part next to the injured when diffed in sodium bicarbonate solution (*J. Agric. Chem. Soc., Japan*, **27**, p. 785-9 ; *Réf. Chem. Abst.*, 1954, 12934 g).
- VAN TIEGHEM (P.). — 1891. *Traité de Botanique*, 2^e éd., Paris, t. 1.
- VAN TIEGHEM (P.) et DOULIOT (H.). — 1888. Recherches comparatives sur l'origine des membres endogènes dans les plantes vasculaires (*Ann. Sc. Nat., Bot.*, 7^e série, **8**, p. 1-660).
- VARGA (M.) et KOVES (E.). — 1959. Phenolic acids as growth and germination inhibitors in dry fruits (*Nature*, G.-B., **183**, n° 4658, p. 401).
- VAUCHER (J. P.). — 1827. *Monographie des Orobanches*, Imprimerie G. Fick, Genève, in-8°, 72 p.
- VELENOVSKY (J.). — 1905. *Vergleichende Morphologie der Pflanzen*, Prague.
- WEHMER (C.). — 1940. Die wirtschaftliche Bedeutung von *Orobanche minor* in Oberdonau (*Angew Bot.*, **22**, p. 177-190).
- WENT (F. W.). — 1953. The effects of rain and temperature on plant distribution in the desert (*Desert research, Proc. Intern. Symp. Jerusalem*, p. 230-237).
- WILLIAMS (A. H.), CORSE (J.), BEAN (R.), WHITING (G. C.), HUGHES (J. C.), HERRMANN (K.), SMITH (R. F.), WEAVING (A. S.), AYERS (A. D.), FORE (H.) et HULME (A. C.). — 1958. Chlorogenic acids in plants materials. Their isolation and determination (*Chem. and Ind.*, **8**, p. 213-217).
- WINTERSTEIN (A.) et STEIN (G.). — 1931. *Ztschr. Physiol. Chem.*, **202**, p. 222. Cité par BRUNEL (A.), 1952, **4**, p. 74).
- WOLF (J.). — 1958. Ueber das Vorkommen von Chlorogensäure und ihren Isomeren in Blättern von Steinobstbaumen (*Naturwissenschaften. Dtsch.*, **45**, n° 6, p. 130-131).
-

TABLE DES MATIÈRES

CONTENUES DANS LE TOME I

Les lianes ligneuses à structure anormale des forêts denses d'Afrique Occidentale, par Madeleine OBATON.....	1
Les diatomées de la Terre Adélie. Campagne du <i>Commandant-Charcot</i> 1949-1950, par Émile MANGUIN	223
Une moisissure nouvelle du sol en Extrême-Orient : <i>Heimiodora verticillata</i> nov. gen. nov. sp., par M ^{mes} Jacqueline NICOT et A. PARGUEY	365
Le développement de la graine chez <i>Allanblackia floribunda</i> Oliv., par Cécile DELAY et Georges MANGENOT	387
Les discomycètes de l'herbier CROUAN (<i>Deuxième série</i>), par Marcelle LE GAL.....	441
Études analytiques et comparées des structures internes des Sigillaires. Notion d'aquixylème dans la série des végétaux fossiles et actuels, par Yves LEMOIGNE ..	469
Mise en évidence d'une unité génétique polarisée et essai d'analyse d'un cas d'inter- férence négative, par Pascal LISSOUBA.....	641
Recherches sur les phanérogames parasites (Étude d' <i>Orobanche Hederæ</i> Duby), par G. PRIVAT	721

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS,
Libraires de l'Académie de Médecine,
120, boul. Saint-Germain, Paris (VI^e).
Dépôt légal : N° 3418, 3^e trim. 1961.
MARCA REGISTRADA

Imprimé en France.

2282-7-61. — Imprimerie CRÉTÉ
Paris, Corbeil-Essonnes.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

ACTION DU PARASITISME SUR LES CARACTÈRES SEXUELS DE L'HÔTE

Vu et approuvé :

Montpellier, le 26 mars 1960.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

P. MATHIAS

Vu

et Permis d'imprimer :

Montpellier, le 28 mars 1960

Le Recteur de l'Académie
de Montpellier

G. RICHARD

